

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЛЕБЕДЕВА  
НАДЕЖДА ОЛЕГОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ СЕРДЕЧНО-  
СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ И ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ СТАТИНАМИ У БОЛЬНЫХ  
САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

14.01.02 – эндокринология

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор,  
Академик РАН  
М.В. Шестакова

Москва – 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Сердечно-сосудистые риски при сахарном диабете .....	13
1.2. Патогенез развития атеросклероза при сахарном диабете .....	15
1.2.1. Классические факторы сердечно-сосудистых заболеваний.....	16
1.2.2. Молекулярно-генетические факторы сердечно-сосудистых заболеваний.....	20
1.3. Статины при сахарном диабете .....	21
1.3.1. Клинические исследования, доказавшие снижение сердечно- сосудистого риска на терапии статинами .....	22
1.3.2. Фармакогенетика .....	24
1.4. Гены-кандидаты развития атеросклероза при сахарном диабете .....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	34
2.1. Дизайн, выборка больных, критерии включения, исключения .....	34
2.1.1. Одномоментное генетическое исследование .....	34
2.1.1.1. Дизайн исследования.....	34
2.1.1.2. Выборка больных.....	34
2.1.1.3. Критерии включения, исключения .....	34
2.1.2. Проспективное фармакогенетическое исследование.....	34
2.1.2.1. Дизайн исследования.....	34
2.1.2.2. Выборка больных.....	34
2.1.2.3. Критерии включения, исключения .....	34
2.2. Методы исследования.....	37
2.2.1. Методы одномоментного генетического исследования .....	38
2.2.2. Методы проспективного открытого исследования фармакогене- тической эффективности статинов.....	39
2.2.3. Специальные методы исследования .....	41

2.2.3.1. Дигитальная тонометрия.....	41
2.2.3.2. Исследование полиморфных маркеров генов - кандидатов атеросклероза .....	41
2.3. Статистическая обработка результатов .....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	51
3.1. Результаты ретроспективного исследования .....	51
3.2. Результаты проспективного исследования.....	63
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	86
ВЫВОДЫ .....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Тяжесть сахарного диабета 2 типа (СД2) определяется системным воздействием гипергликемии на сосудистое русло, которое ведет к множественному поражению органов-мишеней, клинически проявляющемуся в виде диабетических осложнений [1, 2, 3, 4]. Последние являются основной причиной инвалидизации и смерти данных пациентов, что определяет глобальную социальную значимость изучения этой проблемы [3, 5]. При этом атеросклеротическое поражение даже нескольких сосудистых бассейнов у больных СД может длительно протекать бессимптомно, без клинических проявлений, что приводит к поздней диагностике на стадии тяжелых, часто терминальных осложнений: инфаркта миокарда (ИМ), острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), критической ишемии нижних конечностей или внезапной смерти, и, как следствие, к высокой смертности данной категории пациентов [1, 2, 6, 7]. Сосудистые осложнения при СД взаимно отягощают друг друга, приобретая характер патологического сердечно-сосудистого континуума. Бессимптомное «немое» течение ИБС у 50% больных является глобальным фактором риска смертности [7]. Хроническая болезнь почек (ХБП) является второй, после сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), причиной смертности больных с СД2, повышая смертность таких пациентов в 3 раза по сравнению с СД2 без поражения почек [2, 6, 8, 9, 10]. Очевидно, что сочетание нескольких сосудистых осложнений и ХБП приводит к максимальной кумуляции рисков.

К классическим модифицируемым внутренним факторам, способствующим развитию атеросклероза при СД2 относятся хроническая гипергликемия, дислипидемия, артериальная гипертензия (АГ), повышение активности ренин-ангиотензиновой системы (РАС) и воспаление [1, 11, 12]. В ряде исследований показано, что нарушение функции эндотелия (ФЭ) лежит в

основе развития атеросклероза и является одним из самых ранних маркеров ССЗ [13-16], а улучшение ФЭ - одним из ключевых показателей эффективности органопротективной терапии [17-19]. У некоторых больных сосудистые осложнения СД2 относительно рано развиваются и прогрессируют, несмотря на целевые показатели гликемии, липидного профиля и артериального давления (АД), с использованием статинов и препаратов, блокирующих РАС [1, 4, 20-23]. Это позволило предположить, что частота и темпы развития ССЗ, помимо классических модифицируемых факторов, зависят от генетических особенностей пациентов, которые определяют индивидуальную восприимчивость больных к воздействию патологических факторов при СД [24-27].

Особую роль в качестве средств первичной и вторичной профилактики ССЗ и вторичной профилактики атеросклероза играет терапия статинами [15], поскольку эти препараты модулируют липидный обмен и, на основании данных крупных проспективных контролируемых исследований, имеют мощную доказательную базу снижения сердечно-сосудистого риска у больных СД [28-32]. Однако эффективность лекарственных средств может значительно варьировать [13, 14], так, по данным разных источников, резистентность к гиполипидемической терапии достигает 30-75% [13, 26]. Предполагается, что значительный вклад, определяющий индивидуальную выраженность ответа на лекарственные средства, вносят генетические факторы [11, 26, 33]. В этой связи направление фармакогенетики – раздела медицинской генетики и фармакологии, изучающего характер реакций организма на лекарственные средства в зависимости от генетически детерминированных факторов, приобретает высокую актуальность [14, 33-36].

В связи с прогрессирующим характером течения, высокой смертностью и чрезвычайно высокими затратами на лечение – особое значение приобретает ранняя диагностика осложнений, когда патологические изменения потенциально обратимы до нормы [2, 6, 9, 37, 38]. Поэтому определение генетического вклада в развитие ССЗ при СД2 имеет особое значение для оценки

предрасположенности к ССЗ и выделения групп высокого риска на доклинической стадии. Современные геномные технологии открывают новые возможности прогнозирования этой тяжелой многофакторной патологии. Идентификация молекулярно-генетических маркеров ССЗ позволит подойти к возможности оценивать и прогнозировать сердечно-сосудистый риск на доклиническом этапе [39].

Проект данной работы относится к категории фундаментальных исследований, задачей которого является изучение глобальной проблемы ССЗ у пациентов с СД, направленной на решение наиболее актуальных аспектов прогнозирования, ранней диагностики, профилактики и целенаправленного (таргетного) лечения, с целью улучшения прогноза и выживаемости этих больных. Методология исследования использует самые современные возможности с привлечением генных технологий.

### **Степень её разработанности**

Перспективным направлением по изучению генетической предрасположенности к многофакторным заболеваниям, в том числе ССЗ при СД2, является определение полиморфизмов потенциальных генов-кандидатов – генов, продукты экспрессии которых задействованы в патогенезе развития какой-либо конкретной нозологии [6, 40, 41]. Очень важно изучение генетических ассоциаций в конкретных этнических группах. На европеоидной расе, проживающей на территории Российской Федерации, изучение выбранных генов-кандидатов предрасположенности к ССЗ у больных СД2 ещё не проводилось.

Фармакогенетические исследования в мире стали проводиться относительно недавно, и в настоящее время являются одним из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений медицинской науки [42]. До утверждения и начала применения в клинической практике фармакогенетическое тестирование лекарственного препарата проходит

несколько сложных этапов. Проводимые в настоящее время фармакогенетические исследования ряда медикаментов находятся на разных этапах тестирования [43]. Полностью завершённые фармакогенетические тесты следующих препаратов: прогнозирование гиперчувствительности к абакавиру (с возможными тяжёлыми клиническими последствиями) на основе анализа носительства аллеля *HLA-B\*5701*, подбор дозы варфарина на основе тестирования генов *VKORC1* и *CYP2C9* и оценка риска нежелательных лекарственных реакций при применении кодеина по типированию гена *CYP2D6*, являются образцами успешного научного опыта и широко применяются в клинической практике [44-45]. Большая часть проводимых в мире исследований препаратов из группы статинов находятся на начальных этапах фармакогенетического тестирования, что требует дальнейшего научного поиска потенциальных генетических маркеров эффективности гиполипидемического ответа на разных видах и дозах препарата, в разных этнических популяциях [46].

### **Цель исследования**

Оценить генетические факторы сердечно-сосудистых заболеваний, выраженность гиполипидемического ответа и динамику функции эндотелия на терапии статинами в зависимости от полиморфизма генов-кандидатов атеросклероза у пациентов с СД2.

### **Задачи исследования**

1. Изучить ассоциацию аллелей и генотипов 7-ми полиморфных маркеров (пм) потенциальных генов - кандидатов развития атеросклероза: *Pro12Ala* гена *PPARG2*, *G(-308)A* гена *TNF-α*, *G(-238)A* гена *TNF-α*, *E2/E3/E4* гена *APOE*, *I/D* гена *ACE*, *C-514T* гена *LIPC*, *SLCO1 B1\*5* гена *SLCO1B1* с наличием и отсутствием сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у больных СД2.
2. Оценить выраженность гиполипидемического ответа на терапию статинами в

зависимости от полиморфизма перечисленных генов-кандидатов у больных СД2.

3. Оценить показатели ЭФ до и после терапии статинами в зависимости от полиморфизма исследуемых генов-кандидатов у больных СД2.

### **Научная новизна исследования**

В данной работе проведена комплексная оценка молекулярно-генетических факторов в развитии ССЗ при СД2 на основе полигенного молекулярно-генетического исследования потенциальных генов-кандидатов: *TNF- $\alpha$* , *APOE*, *ACE*, *LIPC*, *SLCO1B1*, идентифицированы генетические маркеры, позволяющие прогнозировать группу высокого риска сочетанного развития ССЗ и ХБП, сопряженной с наиболее высоким сердечно-сосудистым риском.

Впервые проведено фармакогенетическое исследование терапии статинами у больных СД2. Определены генетические маркеры эффективности данной терапии, а также аллели и генотипы генов, носительство которых сопряжено с резистентностью к терапии аторвастатином в малых и средних терапевтических дозах. В работе впервые проведена фармакогенетическая оценка динамики ЭФ на терапии статинами, что позволило идентифицировать генетические маркеры улучшения ЭФ на данной терапии. Определены аллели и генотипы комплекса генов, носительство которых ведет к улучшению ЭФ на терапии статинами у больных СД2, а также аллели и генотипы, носительство которых сопряжено с отрицательной динамикой ЭФ на лечении статинами в малых и средних терапевтических дозах. Данные результаты позволяют предложить использовать генетическое обследование в качестве метода персонификации терапии статинами у больных СД2.



## Теоретическая и практическая значимость исследования

Генетическое обследование больных СД2 с оценкой полиморфизма *G(-308)A* гена *TNF-α* позволяет прогнозировать группу риска сочетанного развития ССЗ и ХБП, требующую более активного наблюдения и обследования для выявления патологии на ранних стадиях.

При лечении дислипидемии статинами у больных СД2 необходимо учитывать фактор генетической невосприимчивости (нечувствительности), что может обуславливать неэффективность терапии даже при хорошей комплаентности больного. Генетическое обследование больных СД2 с оценкой полиморфизма генов *APOE* и *PPARG2* можно использовать в качестве перспективного метода персонификации терапии статинами у больных СД2.

## Методология и методы исследования

Методы обследования: общеклинические, позволяющие характеризовать основные клинические факторы развития осложнений при СД (состояние углеводного и липидного обмена, артериальная гипертензия и т.д.) и специальные - амплификация полиморфных участков исследуемых генов при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) «в реальном времени» с последующим изучением различий в частоте распределения отдельных аллелей/генотипов исследуемых полиморфных маркеров, и дигитальная тонометрия, включающая в себя оценку контурного анализа пульсовой волны (измерение индекса отражения - RI, % и индекса ригидности – SI, м/с) и проведение стандартной пробы с реактивной гиперемией с измерением постокклюзионного прироста амплитуды сигнала (ПАС). Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных маркеров в группах с наличием и отсутствием заболевания использовали критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, таблицы сопряженности и критерий хи-квадрат, рассчитывали оценку относительного риска и доверительный интервал для исследований «случай-контроль». Для

сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных маркеров в связанных группах (в одной и той же группе до и через 12 мес терапии статинами) использовали критерий Вилкоксона. Уровень значимости для всех проверяемых гипотез был принят как  $p < 0,05$ .

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Не установлено достоверной ассоциации сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с СД2 (ИМ, ОНМК, периферического атеросклероза сосудов) с полиморфизмом генов, кодирующих ключевые факторы развития атеросклероза: *Pro12Ala* гена *PPARG2*, *G(-308)A* гена *TNF- $\alpha$* , *G(-238)A* гена *TNF- $\alpha$* , *E2/E3/E4* гена *APOE*, *I/D* гена *ACE*, *C-514T* гена *LIPC*, *SLCO1 B1\*5* гена *SLCO1B1*, что может указывать на большее значение в развитии ССЗ негенетических факторов риска.

2. Риск сочетанного развития ССЗ и ХБП у пациентов с СД2 ассоциирован с носительством аллеля *A* и генотипа *GA* пм *G(-308)A* гена *TNF- $\alpha$* , что указывает на участие генетических факторов, кодирующих процессы воспаления, в генезе нефрокардиального синдрома.

3. Генетические факторы оказывают значимое влияние на эффективность терапии статинами: носительство генотипа *ProPro* гена *PPARG2* и генотипов *E4/E4*, *E3/E3* гена *APOE* ассоциировано с более выраженным гиполипидемическим эффектом статинов у пациентов с СД2, носительство генотипа *AlaAla* гена *PPARG2* и генотипов *E2/E4*, *E3/E2*, *E4/E3* гена *APOE* сопряжено с отсутствием снижения атерогенных фракций липидов. Установлены аллели и генотипы генов, носительство которых ассоциировано с улучшением ЭФ на терапии статинами у больных СД2: *GA* пм *G(-308)A* и *GG* пм *G(-238)A* гена *TNF- $\alpha$* , и аллели и генотипы, носительство которых сопряжено с отрицательной динамикой ЭФ на терапии статинами в малых и средних терапевтических дозах: *GG* пм *G(-308)A* и *GA* пм *G(-238)A* гена *TNF- $\alpha$* . Полученные результаты позволяют использовать данную панель пм для

выделения группы пациентов с резистентностью к терапии статинами и персонализации назначения статинов при СД2.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на конференциях: на VII Всероссийском диабетологическом конгрессе, г. Москва, 24-28 февраля 2015 г; на VII Всероссийском конгрессе эндокринологов, г. Москва, 2 марта 2016 года; на 18ом Европейском эндокринологическом конгрессе (ECE) в Мюнхене, 28-31 мая 2016; на 84ом конгрессе Европейского общества по Атеросклерозу (EAS) в Инсбруке, 31 мая 2016 г; на 52ом ежегодном собрании Европейской ассоциации по изучению диабета (EASD) в г. Мюнхене, 15 сентября 2016 г.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 5 статей— в научно-практических журналах, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией Министерства образования и науки РФ.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиография включает 147 источника литературы (из них 33 отечественные и 114 зарубежные). Работа иллюстрирована 19 таблицами и 14 рисунками.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах диссертационной работы: в формулировке цели и задач, в планировании

научного исследования, выборе и реализации комплекса методов обследования, наборе клинического материала, личном обследовании и лечении включенных в исследование пациентов, самостоятельном углубленном изучении научной литературы, систематизации полученных данных, их статистической обработке с описанием и в концептуальном осмыслении полученных результатов.

Так, автором лично выполнено генетическое исследование образцов крови всех пациентов. Автором освоена и лично выполнена всем пациентам динамическая оценка эндотелиальной функции на приборе «Ангиоскан». Автором лично проведен статистический анализ полученных данных с помощью программы SPSS Statistics, v.10.0 (SPSS Inc., США). Личный вклад автора состоит также в самостоятельном написании публикаций по результатам работы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

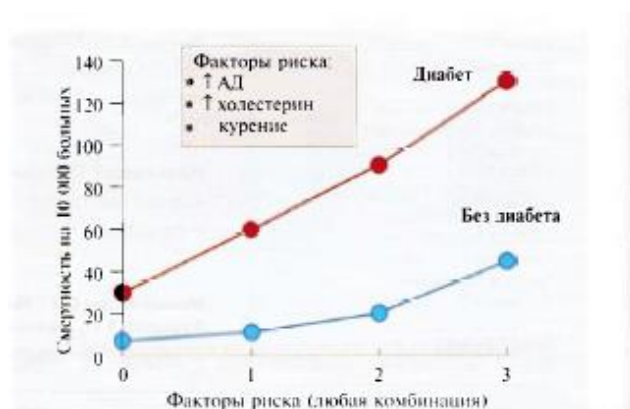
### 1.1. Сердечно-сосудистые риски при сахарном диабете

Пациенты с СД2 относятся к группе высокого риска развития сердечно-сосудистых событий, так атеросклероз магистральных сосудов (сердца, мозга, нижних конечностей) встречается у 70% больных, а ССЗ остаются основным фактором инвалидизации и смертности у 80% пациентов, что определяет глобальную социальную значимость изучения этой проблемы [1-3, 47].

Тяжесть СД2 обусловлена генерализованным поражением сосудистой системы, такого масштабного поражения всего сосудистого русла не происходит ни при одном другом заболевании, с развитием множественных микрососудистых (нефропатия, ретинопатия) и макрососудистых осложнений (ишемическая болезнь сердца (ИБС), коронарный и периферический атеросклероз), которые взаимно отягощают друг друга, приобретая характер патологического сердечно-сосудистого континуума [47-50]. Особенно ярко это проявляется при развитии диабетической нефропатии (ДН), которая в рамках ХБП является второй, после ССЗ, причиной смертности больных с СД2, и признана независимым фактором риска ССЗ и эквивалентом ИБС по риску осложнений и смертности [2, 3, 8, 9, 50]. При этом при СД2 частота развития сердечно-сосудистой патологии в 3-4 раза выше по сравнению с лицами без СД [51]. Так, по данным проспективного исследования, проведенного в Финляндии на большой популяции больных СД2, риск сердечно-сосудистой смертности у больных СД2, не имеющих ИБС, идентичен таковому у лиц без СД, перенесших ИМ [52].

Имеется несколько причин столь высокой предрасположенности больных СД к патологии сердечно-сосудистой системы. Основная из которых заключается в том, что при СД помимо неспецифических факторов риска

атеросклероза играют роль специфические именно для СД2 риски: гипергликемия и связанные с ней - гиперинсулинемия и инсулинорезистентность [2, 47, 53]. В исследования MRFIT наглядно продемонстрирован вклад специфических факторов риска в развитие ССЗ: выявлено, что при равной степени повышения систолического АД смертность от ССЗ при СД2 в 2-3 раза превышает таковую у лиц без СД, а при одинаковой выраженности гиперхолестеринемии сердечно-сосудистая смертность в 2-4 раза превышает таковую у лиц без СД. Наконец, при сочетании трех факторов риска (АГ, дислипидемии и курения) смертность пациентов с СД2 в 2-3 раза выше, чем у лиц без СД (рисунок 1). [54]



**Рисунок 1. Сердечно-сосудистая смертность при сахарном диабете**

К неспецифическим факторам риска атеросклероза относят модифицируемые: АГ, нарушение в ренин-ангиотензиновой системе (РАС), дислипидемию, ожирение, воспаление, курение и гиподинамию; и немодифицируемые: мужской пол, пожилой возраст, менопаузу и отягощенную наследственность по ССЗ [47, 50, 53, 54, 55, 56]. В силу особенностей развития заболевания: возраста дебюта, исходного наличия ожирения и гиподинамии, у пациентов с СД2 имеются в наличии практически все неспецифические факторы риска атеросклероза, что также увеличивает сердечно-сосудистый риск данной категории больных [47, 53].

В силу наличия дополнительных факторов риска, ведущим из которых является гипергликемия, атеросклероз у пациентов с СД2 развивается и прогрессирует быстрее, чем у лиц без СД [40, 52, 53, 57, 58]. Поскольку атеросклеротическое поражение даже нескольких артериальных бассейнов при СД может длительно протекать бессимптомно, приводя к поздней диагностике ССЗ уже на стадии тяжелых, зачастую терминальных осложнений, важной задачей является своевременная профилактика их развития, нацеленная на профилактику факторов риска и, соответственно, торможение патогенетических путей развития атеросклероза [53, 59].

## **1.2. Патогенез атеросклероза при сахарном диабете**

Механизм поражения сосудов крупного и среднего калибра при СД (макроангиопатия) в целом не отличается от атеросклеротического, которое имеет место и у больных без СД, тем не менее при СД, как уже было указано выше, имеются дополнительные факторы прогрессирования атеросклероза, в связи с чем указанное поражение сосудов у больных СД встречается на 8-10 лет раньше, чем у их сверстников, не страдающих диабетом [51, 53, 57, 60]

Модель развития и прогрессирования ССЗ у больных СД2 основывается на концепции совокупного воздействия метаболических и гемодинамических параметров, модулируемых генетическими факторами [53, 60, 61, 62, 63]. При СД2 наряду с гипергликемией имеют место дополнительные, зачастую предсуществующие факторы развития атеросклероза, такие как АГ, дислипидемия, нарушения РАС, воспаление и другие ответственные за комплексную сердечно-сосудистую патологию [53, 60, 61, 62]. Патолофизиологические изменения до развития СД2, классифицируемые как метаболический синдром, уже могут создать условия для развития сосудистых

повреждений, независимо от гипергликемии [53]. Наряду с атеросклерозом у больных СД2 часто параллельно протекают процессы гломерулосклероза, поскольку поражение почек и сосудов при СД имеют общие патогенетические механизмы [2, 6, 8, 64]. Развитие почечной патологии усугубляет течение ССЗ, так в настоящее время ХБП признана независимым фактором сердечно-сосудистой патологии при СД2 [53, 64].

Предполагается влияние статинов не только на показатели липидного обмена, но и на показатели жесткости сосудистой стенки и эндотелиальной функции у пациентов с СД [65-67]. Имеется большое число клинических и экспериментальных исследований, доказывающих участие нарушений эндотелия и эластичных свойств артерий в развитии сосудистых осложнений [60, 68-73].

### **1.2.1. Классические факторы сердечно-сосудистых заболеваний**

К традиционным модифицируемым факторам развития ССЗ при СД2 относятся гипергликемия, АГ, дислипидемия, воспаление и нарушения в системе синтеза ренин-ангиотензин [47, 50, 53, 54, 55, 56].

Гипергликемии отводится ведущая роль в развитии осложнений СД, поскольку гипергликемия запускает каскад патологических реакций, приводящих через разные механизмы воздействия к развитию микро- и макрососудистых осложнений СД [47, 52, 53, 57, 58]. Первая единая теория развития сосудистых осложнений СД вследствие токсического воздействия гипергликемии через образование конечных продуктов гликозилирования была предложена М. Brownlee [74]. В настоящее время помимо данного механизма рассматривают пути воздействия гипергликемии на развитие атеросклероза через гемодинамические нарушения, окислительный стресс, нарушения в системе гемостаза, ангиогенеза и развитие дисфункции эндотелия [53].



АГ является одним из самых опасных факторов риска развития и прогрессирования диабетических микро- и макроангиопатий [53, 75]. Длительное повышение АГ приводит к функциональным и структурным изменениям миокарда, коронарных артерий и проводящей системы сердца: гипертрофии левого желудочка, ИБС, сердечной недостаточности и аритмиям [53]. Каждое из перечисленных состояний ассоциируется с повышенной сердечно-сосудистой смертностью. ИБС – наиболее частое осложнение АГ [48]. Предполагают несколько механизмов поражения коронарных сосудов при АГ. Один из них заключается в том, что высокая постнагрузка на миокард, развивающаяся вследствие АГ, приводит к увеличению напряжения стенок левого желудочка и повышению трансмурального давления, что ведет к нарушению коронарного кровотока в диастолу [53]. Также при АГ развивается дисфункция микрососудов миокарда, приводя к недостаточному поступлению кислорода к миокарду в условиях нагрузки. И, наконец, АГ вызывает механическое напряжение «сдвига» на клетки эндотелия коронарных сосудов, способствуя снижению синтеза вазодилататора - оксида азота (NO). Последнее приводит к более быстрому формированию атеросклеротической бляшки в просвете коронарных сосудов с развитием стенокардии и/или ИМ [76].

Одним из ведущих факторов развития атеросклероза является повышенная концентрация липидов в плазме, поскольку определенные группы липопротеинов обладают высоким сродством к сосудистой стенке и могут способствовать ее повреждению [7, 77-80]. При СД предрасполагающим фактором к развитию атеросклероза является то, что дислипидемия развивается вследствие изменения метаболизма липидов на фоне основного заболевания и является вторичной, при отсутствии первичного генетического нарушения липидного обмена [78-80]. По этой причине и в связи с тем, что при СД имеются комплексные липидные нарушения: сниженный уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), повышенный уровень триглицеридов (ТГ) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), с повышенным содержанием незэстерифицированных

жирных кислот, образованием малых плотных ЛПНП, у больных СД отмечается более быстрое развитие и прогрессирование атеросклеротических изменений, чем у пациентов без СД [53]. В составе ЛПНП холестерин поступает во все периферические ткани организма, включая сосудистую стенку. Принципиальное значение имеют нарушения в спектре частиц ЛПНП, в частности увеличение количества малых плотных ЛПНП, которые более чувствительны к повреждающему действию свободных радикалов. Поскольку окисленные ЛПНП стимулируют высвобождение цитокинов и лизосомальных ферментов, они цитотоксичны для эндотелиальных клеток [80].

Важным открытием стало определение вклада повышенной активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) в развитие как ССЗ, так и других осложнений СД [81-85]. Установлено, что наибольшую роль в поражении органов-мишеней играет гиперактивность локальных (тканевых) РААС, компоненты которых синтезируются непосредственно в органах-мишенях, в том числе в сердце и почках. Клетки этих тканей являются и источником образования АТ II, и мишенью его действия. Механизм развития ССЗ при повышении активности РААС можно описать следующим образом: ангиотензиноген  $\rightarrow$  ангиотензин I (АТ I)  $\rightarrow$  ангиотензин II (АТ II)  $\rightarrow$  рецепторы АТ II  $\rightarrow$  эффекты [82]. Механизмы патогенного действия АП при СД обусловлены как его мощным вазоконстрикторным действием, так и пролиферативной, протромбогенной и прооксидантной активностью. Гиперпродукция АТ II приводит к внутриклубочковой и системной гипертензии. Помимо сосудосуживающей активности, АТ II посредством активации АТ1 - рецепторов стимулирует агрегацию тромбоцитов, адгезию моноцитов и макрофагов, пролиферацию клеток гладкой мускулатуры сосудов и миокарда, вызывая ряд негемодинамических эффектов: вазоконстрикторный, пролиферативный, провоспалительный, и в целом, к склеротическим изменениям тканей и сосудов, таким образом, способствуя развитию ССЗ [83]. Доказательством роли повышенной активности РААС в развитии осложнений

СД2 является то, что применение блокаторов РААС (ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ), блокаторов рецепторов ангиотензина II (БРА)) позволяет предупредить развитие и/или замедлить прогрессирование ССЗ и микрососудистых осложнений СД2 [82].

Значительную роль в повреждении сосудов играет воспаление. При воспалительных процессах поражение сосудистого русла начинается с развития дисфункции эндотелия, поскольку клетки эндотелия выстилают сосуды изнутри и являются первой мишенью действия циркулирующих в крови медиаторов воспаления [83]. Эндотелий сосудов повреждается за счет собственной активации медиаторами воспаления и за счет непосредственной адгезии лейкоцитов на эндотелиальную мембрану. К основным медиаторам воспаления относятся выделяемые лейкоцитами активные формы кислорода (АФК), цитокины типа интерлейкина-1 (ИЛ-1) и *TNF $\alpha$* , которые запускают оксидантное повреждение эндотелия и миокардиоцитов [86]. Адгезия большого числа лейкоцитов к эндотелию коронарных артерий происходит за счет экспрессии молекул адгезии (интегринов, селектинов, кадгеринов, иммуноглобулинов) на поверхности самих лейкоцитов и эндотелиальной мембраны, что затрудняет кровоток, создавая угрозу no-reflow феномена в ходе реперфузии [86-88]. Активные лейкоциты устремляются через стенку эндотелия в субэндотелиальное пространство, запуская процессы вторичного повреждения эндотелия сосудов и, например, сердечной мышцы в ходе реперфузии зоны ишемии, обуславливая реперфузионное повреждение миокарда. Доказательством этого механизма повреждения сосудов является то, что при удалении лейкоцитов из крови, эндотелий коронарных артерий при реперфузии повреждается меньше, и наоборот [89-90].

Таким образом, поскольку эндотелий сосудистой стенки является первым слоем клеток, своего рода барьером, который сталкивается с неблагоприятным воздействием гемодинамических и метаболических нарушений, все известные факторы риска развития атеросклероза (перечисленные выше), которые

сконцентрированы у больных СД2, оказывают неблагоприятное влияние на эндотелий, вызывая его дисфункцию [83, 85, 87]. В связи с этим при изучении механизмов развития ССЗ все больше внимания уделяется изучению артериальной стенки, включающему оценку состояния эндотелиального слоя и жесткости артерий. При этом особая роль отводится дисфункции эндотелия, сопровождающейся нарушением способности продуцировать оксид азота, а также увеличению жесткости артерий эластического и мышечного типа [71, 76]. Увеличение жесткости артериальной стенки у больных диабетом связывают с процессом гликирования эластиновых волокон, входящих в ее состав, и относят к начальным сосудистым изменениям, приводящим в дальнейшем к развитию атеросклероза [4, 68, 70, 72].

### **1.2.2 Молекулярно-генетические факторы сердечно-сосудистых заболеваний**

У части пациентов, при сопоставимом количестве и виде немодифицируемых факторов, наблюдается быстрое развитие и прогрессирование сосудистых осложнений СД2, несмотря на комплексную коррекцию модифицируемых факторов риска (гипергликемии, гипертонии, дислипидемии, воспаления), с применением статинов и препаратов из группы иАПФ/БРА [2, 6, 37, 53]. Это указывает на влияние дополнительных факторов риска ССЗ. Согласно одной из теорий развития атеросклероза, и, как следствие, ССЗ, в генезе атеросклероза первичен наследственный дефект сосудистой стенки [59, 63]. Это позволило предположить значимое участие молекулярно-генетических факторов в развитии ССЗ при СД2 [40]. Изучение наследственной предрасположенности к многофакторным заболеваниям, к которым относятся СД2 и ССЗ крайне важно для их диагностики и терапии [40, 59]. Можно

предполагать влияние генов, продукты которых участвуют в основных патогенетических механизмах развития сосудистых осложнений СД2, а именно генов инсулинорезистентности, липидного обмена, РААС и факторов воспаления [9, 53, 59, 63].

### **1.3. Статины при сахарном диабете**

Нарушение обмена липидов и апобелков — также хорошо известные факторы ИБС и сосудистых осложнений. Повышение риска в данном случае связано с увеличением плазменного уровня триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), снижением содержания холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [78]. Поэтому особую роль в качестве средств вторичной профилактики атеросклероза и снижения риска сердечно-сосудистых исходов играет гиполипидемическая терапия [7, 15, 78]. Препаратами выбора в качестве гиполипидемической терапии у пациентов с СД2 являются статины [15, 18]. Гиполипидемический эффект статинов основан на конкурентном ингибировании ключевого фермента синтеза ХС — 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы) [32, 91]. При угнетении синтеза ХС и снижении его содержания в печени повышается активность ЛПНП-рецепторов гепатоцитов, осуществляющих захват из крови циркулирующих ЛПНП и, в меньшей степени, ЛПОНП и ЛПП. Это приводит к уменьшению в крови концентрации ЛПНП и ХС, а также к умеренному снижению уровня ЛПОНП и ТГ [91]. При применении статинов отмечают также улучшение кровоснабжения миокарда и уменьшение постнагрузки на сердце, что предположительно связано с улучшением структурно-функциональных свойств мембран тромбоцитов на фоне уменьшения процессов ПОЛ. Они также вызывают регресс атеросклеротического процесса в сосудистой стенке [78]. В

ряде крупных клинических исследованиях доказано, что применение статинов позволяет существенно снизить сердечно-сосудистый риск у данной категории больных [27-31].

### **1.3.1. Клинические исследования, доказавшие снижение сердечно-сосудистого риска на терапии статинами**

Первые исследования по изучению эффективности статинов в первичной профилактике ИБС были выполнены в 90-х годах (MARS, CCAAT, MAAS, PLAC I), по данным которых, применение статинов приводило к существенному (24–42%) снижению количества коронарных событий [92-95]. В настоящее время эффективность статинов в профилактике ССЗ полностью доказана. По данным масштабных проспективных исследований (Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), Cholesterol And Recurrent Events (CARE), Long – term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID), West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) и др.), смертность от ССЗ на фоне продолжительного лечения статинами снижается на 30%, в основном за счет уменьшения риска развития острого ИМ и других осложнений ИБС [27-32, 96-97]. Результаты исследования HPS (Heart Protection Study) показали, что статины достоверно как сердечно-сосудистую, так и общую смертность [97]. По результатам мета-анализа, включившего данные 13 исследований ([99], всего 17 963 пациента) и исследований PROVEIT, посвященного агрессивной терапии статинами, в первые 14 дней госпитализации по поводу острого коронарного синдрома (средняя длительность наблюдения составила 6 мес), было выявлено, что у больных, получавших статины, реже развивались ишемия и сердечно-сосудистая смерть [100]. Данные этих исследований были суммированы в обновленных рекомендациях Европейского общества кардиологов по лечению

стабильной ИБС (2013 г.), где указано, что пациенты со стабильной ИБС расцениваются как группа очень высокого риска сердечно-сосудистых осложнений, в связи с чем им показано назначение статинов с достижением целевых значений ЛПНП менее 1,8 ммоль/л и/или уменьшение их уровня более, чем на 50% от исходного (класс рекомендаций I, уровень доказательности A) [101]. Кроме того, статины играют важную роль как при первичной, так и при вторичной профилактике инсультов [53]. Впервые это было выявлено в большом исследовании 4S, в котором на фоне проведения липидоснижающей терапии частота неэмболических ишемических инсультов и транзиторных нарушений мозгового кровообращения снижалась на 51 и 35%, соответственно [27]. Неоднократно была доказана эффективность назначения статинов для профилактики инсульта у пациентов высокого риска без ИБС: в исследовании ASCOT-LLA (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial – Lipid Lowering Arm) применение аторвастатина привело к значимому снижению риска инсульта у пациентов с артериальной гипертонией (на 27%), в исследовании CARDS (Collaborative Atorvastatin Diabetes Study) – у больных СД2 (на 48%) [98, 102]. В исследовании SPARCL (Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels) был однозначно подтвержден тот факт, что статины достоверно снижают риск повторных цереброваскулярных событий вне зависимости от наличия ИБС. Назначение аторвастатина приводило к значительному уменьшению риска инсультов в целом и, в частности, ишемических инсультов (фатальных и нефатальных). Также в этом исследовании было выявлено, что свой эффект статины реализуют в основном за счет снижения уровня ОХС и ЛПНП [103].

Не смотря на все доказательства бесспорной эффективности статинов в снижении сердечно-сосудистого риска, у части больных выявляется резистентность к статинам [7]. Значимый вклад в развитие «неблагоприятных» ответов на лекарственные средства вносят генетические факторы [7, 11, 13, 14]. Это обусловлено с одной стороны тем, что фармакокинетические и фармакодинамические процессы метаболизма лекарственных средств, в том

числе статинов, находятся под генетическим контролем. А с другой стороны - метаболизм липопротеинов регулирует комплекс метаболических и клеточных процессов, на которые, в свою очередь, влияют генетические факторы и окружающая среда [7, 11, 13, 18].

### **1.3.2. Фармакогенетика**

Применение доказательного подхода в медицине, при котором решения об использовании профилактических, диагностических и лечебных мероприятий принимаются, исходя из имеющихся доказательств их эффективности и безопасности на основании результатов крупномасштабных рандомизированных клинических испытаний, позволило в значительной степени улучшить качество оказываемой в настоящее время медицинской помощи. Тем не менее, эффективность фармакотерапии не достигает желаемого уровня и, по данным Всемирной Организации Здравоохранения за 2009 г, составляет 60% [13]. Такой относительно невысокий показатель может быть обусловлен тем, что для клинических исследований отбирают сравнительно однородную когорту респондентов, согласно критериям включения/исключения протокола, и, соответственно, их результаты применимы для «среднестатистического» пациента и могут не подходить конкретному больному, имеющему ряд индивидуальных характеристик. Это послужило толчком к изучению индивидуальных особенностей пациентов, влияющих на эффективность фармакотерапии. Роль наследственности в формировании индивидуального ответа на лекарственные средства предполагалась давно, тем не менее именно развитие молекулярной биологии и реализация международной программы «Геном человека» привело к пониманию механизмов, связывающих генетические особенности пациента с изменением эффективности и



безопасности фармакотерапии. Поэтому современная медицина направлена на индивидуальный подход к каждому пациенту и движется в сторону персонализации фармакотерапии [14]. Развитие персонализированной медицины во многом обусловлено прогрессом в области фармакогенетики. Клиническая фармакогенетика – это раздел клинической фармакологии и клинической генетики, изучающий место и роль генетических факторов в формировании ответа организма человека на лекарственные средства (ЛС): эффективность, неэффективность, развитие неблагоприятных побочных реакций (НПР) [13]. Закономерности, выявляемые фармакогенетикой, позволяют врачу индивидуально подходить к выбору как самих ЛС, так и их доз у каждого конкретного пациента, обеспечивая максимально эффективную и безопасную фармакотерапию [25].

Клиническая фармакогенетика изучает особенности генетического аппарата, которые приводят к выраженности фармакологического ответа на ЛС у разных людей. Данные генетические факторы представляют собой полиморфные участки генов, продукты которых принимают участие в основных фармакокинетических и фармакодинамических процессах. При носительстве полиморфных аллелей «фармакокинетических» генов изменяется синтез ферментов биотрансформации и белков-транспортеров лекарственных средства. Соответственно, «фармакодинамические полиморфизмы» – это мутации в генах, кодирующих «молекулы-мишени» лекарственных средств (рецепторы, ферменты, ионные каналы) и в генах, продукты которых вовлечены в патогенетические процессы (например, факторы свертывания крови, аполипопротеины). Наличие мутаций нарушает работу гена и приводит к синтезу белков с повышенной или пониженной активностью, синтезу неизмененного белка в избыточном или недостаточном количестве или полному отсутствию его образования. Клинически эти нарушения проявляются в изменении фармакологического ответа на лекарственное средство различной направленности [14].

Генетические особенности пациентов, связанные с изменениями фармакологического ответа, можно выявить при проведении фармакогенетического тестирования. Фармакогенетический тест – это выявление конкретных генотипов, ассоциированных с изменением фармакологического ответа. В основе таких тестов лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР). При этом в качестве источника ДНК обычно используют кровь больного или соскоб «буккального» эпителия. Сбор такого генетического материала не требует предварительной подготовки и дополнительных усилий от пациента. Результаты фармакогенетического теста представляют собой идентифицированные генотипы больного по тому или иному полиморфному маркеру [25].

Направление фармакогенетических исследований в мире находится на начальном этапе. Наиболее изучена фармакогенетика терапии антикоагулянтами и нейрорептиками. Так, на основе фармакогенетического тестирования, предложен калькулятор подбора доз варфарина в зависимости от полиморфизма гена *SLCO1B1* [25].

Целью большинства работ, посвященных фармакогенетике статинов, являлась оценка резистентности к терапии и возможные побочные эффекты действия препаратов. В то время как чувствительность к терапии статинами практически не изучалась. Так, из работ по изучению фармакогенетике статинов, самыми достоверными в настоящее время являются данные отчета D.I. Chasman и соавторов о недостаточном гиполипидемическом эффекте правастатина у 7 % пациентов-носителей определенного генотипа ГМГ-КоА (снижение уровня ХС соответственно на 14 и 19 %), но если это преодолимо применением более высоких доз препарата, то клиническое значение этих индивидуальных различий незначительно [104].

В развитии ССЗ, а также устойчивости к терапии статинами у больных СД2 предполагают влияние следующих генов: модулирующих нарушения липидного обмена (*APOE*, *LIPC*, *SLCO1 B1*), процессы воспаления (*TNF-α*),

кодирующих продукцию вазоактивных факторов эндотелия (*ACE*) и вовлечённых в систему синтеза и секреции инсулина (*PPARG2*) [7].

#### **1.4. Гены-кандидаты развития атеросклероза при сахарном диабете**

Гипергликемия является ключевым фактором в патогенезе сосудистых осложнений при СД2. Изучение патогенетических механизмов воздействия продуктов экспрессии генов, вовлеченных в синтез и секрецию инсулина, также указывает на влияние продуктов этих генов на развитие СД2 и его осложнений [105]. Известно несколько генетических полиморфизмов, которые влияют на функцию и на выживание  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Одним из наиболее перспективных генов данной группы представляется *PPARG2* [106].

##### **1.4.1. Ген рецептора, активируемого пролифератором пероксисом гамма 2 (*PPARG2*)**

Ген *PPARG2* кодирует ядерный рецептор *G2*, активация которого индуцирует экспрессию многих генов липогенеза и ингибирование липолиза, что в свою очередь повышает чувствительность тканей к инсулину. Полиморфизм гена *PPARG2Pro12Ala*, ведущий к снижению синтеза белка данного рецептора, показал достоверную ассоциацию с развитием ожирения и СД 2. Установлено, что мутации в гене *PPARG* являются причиной *PPARG2* лиганд-резистентного синдрома, который проявляется комплексом инсулинорезистентности, дислипидемии, гипертензии, увеличения массы тела и нарушения гомеостаза глюкозы. Установлено, что пациенты с генотипом *AlaAla* предрасположены к большему набору веса [24, 106].

### 1.4.2. Ген аполипопротеина Е (APOE)

Основную роль в транспорте липидов играет Аполипопротеин Е (apoE). Он входит в состав обоих apoB-содержащих липопротеинов – ЛПОНП и ЛПНП, и в состав антиатерогенных липопротеинов – ЛПВП. Ключевая функция apoE заключается в доставке холестерина к тканям от мест его синтеза или всасывания [19].

Транспорт холестерина происходит путем взаимодействия данного апобелка с apoB и E- рецепторами (ЛПНП-рецепторами), расположенными на мембранах клеток периферических тканей и гепатоцитов. ApoE связывается с рецепторами только после воздействия липопротеинлипазы на липопротеины и удаления аполипопротеина С, который маскирует участки распознавания рецепторов. В ходе образования атеросклеротической бляшки происходит усиленный синтез макрофагами apoE и фосфолипидов с образованием комплексов, способных связывать и удалять холестерин из клеток (apoE-опосредованное удаление холестерина) [19]. Поэтому можно предполагать, что мутации в гене аполипопротеина Е ассоциированы риском развития ССЗ [20, 107].

Ген аполипопротеина Е расположен на длинном плече хромосомы 19 – 19q13.32 и состоит из 4 экзонов, 3 интронов, 3597 пар нуклеотидов, существует около 30 вариантов гена ApoE [108]. Комбинация двух точечных мутаций гена ApoE составляют три основных аллеля: *e2*, *e3* и *e4*, отличающиеся между собой аминокислотами в положениях 112 и 158. Это мононуклеотидные полиморфизмы C/T, приводящие к аминокислотным заменам Arg→Cys в позициях 112 и 158 полипептидной цепи, и, соответственно, к образованию изоформ *e2* – 112 Cys, 158 Cys; *e3* – 112 Cys, 158 Arg; *e4* – 112 Arg, 158 Arg [19]. В результате существует шесть возможных полиморфных маркеров гена APOE: *e2/e2*, *e2/e3*, *e3/e3*, *e4/e2*, *e4/e3*, *e4/e4*. Частота встречаемости аллеля *e2* - порядка

7%, частоты аллеля *e4* - от 5 до 15%, генотип *e3/e3* наиболее распространен - до 60% в европейской популяции [108]. Соответственно аллельным вариантам, существует 3 вида белка АпоЕ. Белок АпоЕ3 характеризуется наличием аминокислоты цистеина в положении 112 и аргинина в положении 158: АпоЕ3 (cys112, arg158). Белок АпоЕ2 имеет цистеин как в положении 112, так и 158: АпоЕ2 (cys112, cys158). Белок АРОЕ4 имеет аргинин и в положении 112, и в 158: АпоЕ4 (arg112, arg158). Аминокислотные замены влияют на структуру АпоЕ, его стабильность и сродство с рецепторами. В результате меняется метаболизм липопротеинов, что может предрасполагать к липидным нарушениям и их последствиям. Показано, что *e2* изоформа плохо связывается с apoB, E - рецепторами, а *e4* – наоборот [19].

Белок АпоЕ человека состоит из 299 аминокислот и двух доменов: один связывается с липидом, а второй определяет связывание с АпоЕ-рецепторами на клетках печени и клетках периферических тканей, удаляя избыток ЛПНП, хиломикронов из крови. Также АпоЕ модулирует активность липопротеиновой липазы - фермента, катализирующего расщепление фосфолипидов и триглицеридов, хиломикронов и ЛПОНП [108].

В ряде работ показано, что аллели полиморфного маркера *e2/e3/e4* гена *APOE* определяют индивидуальные и межэтнические вариации липидов плазмы -можно сказать, что данный маркер связан с изменением метаболизма липопротеинов [108].

Предполагают ассоциацию полиморфного маркера *e2/e3/e4* гена АРОЕ с развитием атеросклероза, гиперхолестеринемией, гиперлипопротеинемией III, болезнью Альцгеймера, ишемической болезни сердца, нарушениям памяти у пожилых, рассеянного склероза [108-110].

### 1.4.3. Ген полипептида С, транспортирующего органические анионы (*SLCO1B1*)

Ген *SLCO1B1* - ген полипептида С, транспортирующего органические анионы (ОАТР-С). Экспрессия ОАТР-С происходит на базолатеральной мембране гепатоцитов. Функция полипептида связана с захватом и переносом статинов из крови в печень [111]. Полиморфизм *SLCO1B1*\*5 (с.521Т>С, rs4149056) приводит к изменению функциональной активности данного транспортера: у носителей с.521С аллеля снижена работа белка-переносчика, следствием чего является замедление переноса статинов в печень и увеличение их концентрации в крови, что приводит к негативным воздействиям на мышечную ткань, в максимальной степени проявляющимися развитием рабдомиолиза [112].

На сегодняшний день, по рекомендациям Европейского научного фонда, генотипирование *SLCO1B1* включено в фармакогенетическое тестирование для прогнозирования развития миопатий у пациентов, которым планируется назначение статинов, и подбора дозы препарата [13]. Можно предположить, что замедление метаболизма статинов у обладателей аллеля С в конечном итоге отразится и на эффективности гиполипидемической терапии [112].

### 1.4.4. Ген печеночной липазы (*LIPC*)

Ген печеночной липазы (*LIPC*)- ключевой фермент метаболизма липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Гидролиз фосфолипидов и триглицеридов печеночной липазой ведет к превращению крупных частиц ЛПВП2 в маленькие плотные частицы ЛПВП3 и может вызывать приток ХС в печень [113]. Таким образом, печеночная липаза участвует в обратном

транспорте ХС и является основным фактором, влияющим на уровень ЛПВП в плазме. Фермент участвует также в образовании маленьких плотных ЛПНП и, по некоторым данным, может быть вовлечена в клиренс постпрандиальных липидов [113].

Активность фермента является основным фактором метаболизма липопротеинов. Активность данного фермента снижается на фоне терапии статинами и зависит от полиморфизма *LIPC* (C514T). Также на активность фермента влияют пол и масса абдоминального жира [113, 114]. Имеются данные об ассоциации полиморфных вариантов гена *LIPC* с выраженностью атеросклероза [115].

В одной из работ было показано, что носители генотипов СТ и ТТ имели меньшую функциональную активность фермента и более высокий уровень ЛПВП в крови по сравнению с гомозиготами по аллелю С [116]. В другой работе выявлено положительное влияние на динамику ЛПНП и ЛПВП и больший регресс атеросклероза коронарных артерий у СС - носителей по сравнению с носителями других генотипов *LIPC* [117]. Однако данные результаты не были получены при наблюдении за более длительный период времени. Масштабных исследований по изучению ассоциации полиморфизма *LIPC* с эффективностью терапии статинами не проводилось.

#### **1.4.5. Ген фермента, превращающего ангиотензин I (*ACE*)**

Ген *ACE*–фермента, превращающего ангиотензин I, расположен на длинном плече хромосомы 17 (17q23) и кодирует фермент, превращающий ангиотензин I [118]. Наиболее значимый вклад в развитие патологии, по данным литературы, вносит полиморфный маркер (*I/D*) гена *ACE*, расположенный в интроне 16 [22]. Данный полиморфизм обусловлен наличием (*I*) или отсутствием

(*D*) вставки мобильного крупноразмерного элемента *Alu*, длина которого составляет 289 п.н. Этот полиморфизм влияет на степень экспрессии данного гена и регулирует, таким образом, уровень АП - основного фактора развития и прогрессирования атеросклероза [21]. У здоровых лиц с *DD* генотипом определяется максимальный уровень АПФ крови, у людей с *II* генотипом уровень АПФ крови вдвое ниже, а у гетерозигот уровень фермента крови промежуточный [118].

В настоящее время предполагают ассоциацию полиморфного маркера *I/D* гена *ACE* с сосудистыми осложнениями СД2 [21]. Так, в ходе Фрамингемского обследования 3095 человек было установлено, что носительство *D* аллеля гена *ACE* ассоциируется с более высоким уровнем АД, особенно диастолического, у мужчин. Для женщин таких закономерностей не было выявлено [119].

Получены данные об ассоциации полиморфизма гена *ACE* с дисфункцией эндотелия, а также с процессами ремоделирования сосудистой стенки и атерогенеза [22]. У пациентов с *DD* генотипом отмечалась большая степень дисфункции эндотелия, а также значительно чаще развивался рестеноз коронарных артерий [120]. Таким образом, можно предполагать влияние полиморфного маркера гена *ACE* на эндотелиальную функцию, развитие и прогрессирование сосудистой патологии у пациентов с СД2.

#### **1.4.6. Ген фактора некроза опухоли $\alpha$ (*TNF- $\alpha$* )**

Ген *TNF- $\alpha$*  расположен на коротком плече 6 хромосомы (6p21.3). Кодированный геном основной провоспалительный цитокин  $\alpha$  представляет собой полипептид, состоящий из 233 аминокислот и имеющий длинную лидерную последовательность из 76 остатков, полиморфизм данного гена ассоциированы с ожирением и инсулинорезистентностью [121].



Фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) – основной провоспалительный цитокин, секретирующийся преимущественно моноцитами или макрофагами. TNF- $\alpha$  имеет цитотоксическое, иммуномодулирующее и провоспалительное действие и принимает участие в противовирусном, противоопухолевом и трансплантационном иммунитете [121]. TNF- $\alpha$  вызывает активацию фагоцитов и высвобождение медиаторов воспаления. В высокой концентрации TNF- $\alpha$  может повреждать клетки эндотелия и повышать сосудистую проницаемость, вызывать активирование системы гемостаза и комплемента. TNF- $\alpha$  влияет на липидный обмен и инсулинорезистентность. Влияние TNF- $\alpha$  на инсулинорезистентность происходит путем ослабления трансдукции инсулинового сигнала из-за снижения активности тирозинкиназы рецептора инсулина и фосфорилирования серина в субстрате инсулинового рецептора-1/IRS-1 [122].

Поиск маркеров ранней диагностики ССЗ и фармакологической эффективности статинов у больных СД2 и методов активного воздействия на них позволил бы предотвратить или отсрочить прогрессирование атеросклероза [123].

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Дизайн исследования, выборка больных, критерии включения, исключения**

Исследование проводилось на базе института диабета ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ ЭНЦ) (директор института диабета: д.м.н. проф. член. корр. РАН Шестакова Марина Владимировна).

Выделение ДНК и анализ полиморфных маркеров генов осуществлялись на базе ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России (заведующий лабораторией к.м.н. Никитин Алексей Георгиевич).

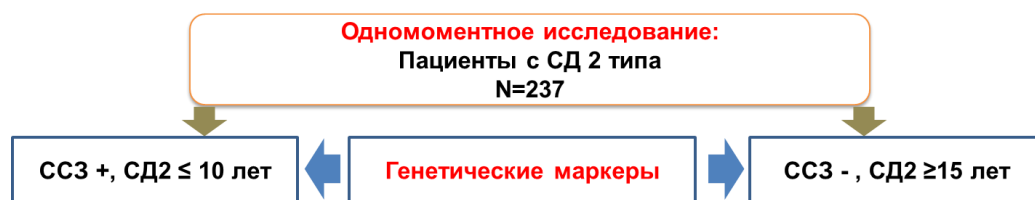
Работа состояла из двух частей:

- I.** одномоментное исследование генетических маркеров риска ССЗ при СД2;
- II.** проспективное фармакогенетическое исследование эффективности терапии статинами у больных СД2.

#### **2.1.1. Одномоментное генетическое исследование**

##### **2.1.1.1. Дизайн исследования**

Дизайн одномоментного исследования представлен на рисунке 2.



**Рисунок 2. Дизайн одномоментного исследования**

При формировании групп использовали неперекрывающиеся критерии отбора. Группа «ССЗ-» включала больных СД2 с отсутствием ССЗ ( $n = 97$ ), длительностью СД2 более 15 лет. Группа «ССЗ+» включала больных СД2 с наличием ССЗ, длительностью СД2 10 лет и менее ( $n = 136$ ).

#### **2.1.1.2. Выборка больных**

В исследование было включено 237 пациентов с СД2, обратившихся в ФГБУ ЭНЦ в период с 2012 по 2015 годы, которые были распределены на две группы с полярными фенотипами патологии в зависимости от наличия или отсутствия ССЗ и длительности СД.

#### **2.1.1.3. Критерии включения, исключения**

##### **Критерии включения**

1. Наличие ССЗ (и/или ИБС, ИМ, ЦВБ, ОНМК, периферический атеросклероз со стенозом  $> 50\%$  любого сосудистого бассейна) при длительности СД2  $\leq 10$  лет от момента постановки диагноза.

2. Отсутствие ССЗ при длительности СД2  $\geq 15$  лет от момента постановки диагноза.

3. Наличие подписанного пациентом информированного согласия на участие в исследовании.

### Критерии исключения

1. Развитие ССЗ ранее дебюта СД2.
2. Другие типы СД.

У всей когорты больных были исследованы 7 полиморфных генетических маркеров развития атеросклероза.

Исследование одобрено протоколом локального этического комитета ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ № 7 от 12.11.12.

## 2.1.2. Проспективное фармакогенетическое исследование

### 2.1.2.1. Дизайн исследования

Дизайн проспективного исследования представлен на рисунке 3.



Рисунок 3. Дизайн проспективного исследования

### **2.1.2.2. Выборка больных**

В исследование было включено 122 больных СД2 и дислипидемией, которым была впервые назначена терапия статинами (аторвастатин в дозе 10 или 20 мг), длительностью 52 недели, 97 пациентов полностью завершили протокол.

До начала терапии и через 12 мес. лечения оценивались показатели липидного профиля (ХС, ЛПНП, липопротеины высокой плотности (ЛПВП), триглицериды (ТГ)) и параметры ЭФ методом цифровой тонометрии.

### **2.1.2.3. Критерии включения, исключения**

#### **Критерии включения**

- Пациенты с длительностью СД2  $\geq 1$  года и дислипидемией, ранее не получавшие гиполипидемической терапии.
- Возраст: 18 - 80 лет.
- HbA1c  $< 10,0\%$ .
- Уровень липидов крови: холестерина (ХС)  $> 4,5$  ммоль/л и/или липопротеинов низкой плотности (ЛПНП)  $> 2,6$  ммоль/л.
- Подписанное информированное согласие.

#### **Особые указания**

Пациенты продолжали прежнюю сахароснижающую и антигипертензивную терапию ингибиторами АПФ (иАПФ) или блокаторами рецепторов ангиотензина II (БРА) на протяжении всего периода исследования с целью исключения возможного влияния на результаты других факторов, изменяющих ЭФ.

При развитии потребности в интенсификации данных видов терапии в период наблюдения пациенты исключались из исследования.

Так, из 122 пациентов - 97 завершили протокол полностью (9 человек прекратили прием препарата вне связи с медицинскими показаниями, 11 человек не смогли приехать на динамический контроль, у 2 человек развилась миалгия на фоне приема статинов, у 1 отмечалось повышение печеночных трансаминаз более 2,5 норм).

С целью оценки эффективности статинов *per se* и предупреждения влияния высоких доз на достижение терапевтического эффекта применялось назначение статинов в малой и средней терапевтической дозе (10–20 мг).

#### **Критерии не включения в исследование**

- HbA1c, %  $\geq 10,0\%$ .
- стандартные противопоказания к терапии статинами.

Исследование было одобрено протоколом ЛЭК ФГБУ ЭНЦ № 7 от 12.11.12.

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Методы одномоментного генетического исследования**

Методы одномоментного генетического исследования включали в себя сбор анамнестических данных, представленный далее (раздел 2.2.1.1), и генетическое исследование полиморфных маркеров генов – кандидатов развития атеросклероза, описанное в разделе 2.2.3. «специальные методы исследования».

### **2.2.1.1. Сбор анамнестических данных**

1. Возраст.
2. Время дебюта и длительность СД2.
3. Время дебюта и длительность ССЗ.
4. Время начала и длительность снижения почечной функции (появление МАУ/снижение СКФ).
5. ИМТ.
6. Уровень липидного профиля (ХС, ЛПНП, ТГ, ЛПВП).
7. Наличие, уровень и длительность АГ (САД и ДАД).
8. Данные о приеме (длительности) статинов.
9. Данные о приеме (длительности) препаратов из группы ингибиторов РАС или БРА.
10. Статус курения.
11. Наследственные данные по АГ, ССЗ и СД2.
12. Наличие сопутствующей соматической патологии.

### **2.2.2. Методы проспективного открытого исследования фармакогенетической эффективности статинов**

Методы проспективного открытого исследования фармакогенетической эффективности статинов включали в себя сбор анамнестических данных и клинико-лабораторное обследование больных, представленные далее (разделы 2.2.2.1, 2.2.2.2, 2.2.2.3), а также - специальные методы исследования, описанные в разделе 2.2.3. «специальные методы исследования».

### **2.2.2.1. Сбор анамнестических данных**

1. Наличие перенесенных и детских инфекций.
2. Наличие соматических, наследственных, аутоиммунных заболеваний.
3. Время дебюта СД2.
4. Время дебюта ССЗ.
5. Время начала снижения почечной функции (появление МАУ / снижение СКФ).
6. Данные о приеме статинов.
7. Данные о наличии миалгий, рабдомиолиза.
8. Данные о патологии печени.
9. Данные о приеме (длительности) препаратов из группы ингибиторов РААС или блокаторов рецепторов к ангиотензину.
10. Наследственные данные по АГ, ССЗ и СД2.

### **2.2.2.2. Объективное исследование**

Объективное обследование включало сбор жалоб, антропометрическое обследование, измерение температуры тела, артериального давления, обследование органов кровообращения и дыхания, пальпацию живота, наличие перитонеальных и почечных симптомов, определение наружных отеков. Расчет индекса массы тела (ИМТ) производился по формуле отношения массы тела в килограммах к квадратному значению роста, выраженному в метрах ( $\text{кг}/\text{м}^2$ ).

Пациенты были осмотрены кардиологом, специалистом кабинета диабетической стопы, офтальмологом, неврологом. Обследование проводилось на базе института Диабета ФГБУ ЭНЦ.



### **2.2.2.3. Лабораторные методы**

Всем пациентам было проведено стандартное лабораторное обследование на базе биохимической лаборатории ФГБУ ЭНЦ (заведующий лабораторией – врач высшей квалификационной категории Ильин А.В.). Обследование включало клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови (ХС, ТГ, ЛПВП, ЛПНП, креатинин, мочевины), коагулограмму, исследование мочи на утреннюю альбуминурию и суточную протеинурию.

Компенсация углеводного обмена оценивалась по уровню гликированного гемоглобина ( $HbA_{1c}$ ), определяемого методом ионно-обменной хроматографии на автоматическом биохимическом анализаторе Bio-RADD-10 (Франция) по стандартной методике производителя.

Всем больным производился расчет СКФ по стандартной формуле MDRD.

### **2.2.3. Специальные методы исследования**

Специальные методы исследования включали в себя дигитальную тонометрию, проведенную всем пациентам проспективного открытого исследования (раздел 2.2.3.1), и генетическое исследование полиморфных маркеров генов – кандидатов развития атеросклероза, общее для одномоментного и проспективного исследования (раздел 2.2.3.2).

### 2.2.3.1. Дигитальная тонометрия

Исследование «дигитальная тонометрия» включало оценку контурного анализа пульсовой волны (измерение индекса отражения - RI, % и индекса ригидности – SI, м/с) и проведение стандартной пробы с реактивной гиперемией с измерением постокклюзионного прироста амплитуды сигнала (ПАС) на приборе «АнгиоСкан-01» (ООО "Ангиоскан-Электроникс", Москва) (рисунок 4).

Для оценки контурного анализа пульсовой волны во время проведения исследования фиксировались: репрезентативная кривая пульсовой волны объема, зарегистрированная с рабочей руки; точки максимумов прямой и отраженной волны на данной кривой, а также - временной анализ с определением времени между прямой и отраженной волной.

Величина индекса жесткости (SI) (размерность - м/с) коррелирует со скоростью распространения пульсовой волны. Расчет данного показателя косвенно позволяет оценить ригидность аорты. Для измерения SI рост испытуемого в метрах делится на время между прямой и отраженной волной. В свою очередь, ригидность аорты зависит от возраста испытуемого и его артериального давления. Среднее артериальное давление относительно постоянно и рассчитывалось по формуле (Б. Фолков, Э. Нил, 1976):  $P_{ср} = P_{диаст} + (P_{сис} - P_{диаст})/3$ ;

Амплитудный анализ с расчетом индекса отражения (RI) позволяет оценить тонус мелких резистивных артерий. Для вычисления RI амплитуда отраженной волны была разделена на величину амплитуды прямой волны, и полученное число умножалось на 100%. Нормальный RI – 50% и менее, т.е. амплитуда отраженного сигнала не должна превышать половины амплитуды прямой волны.

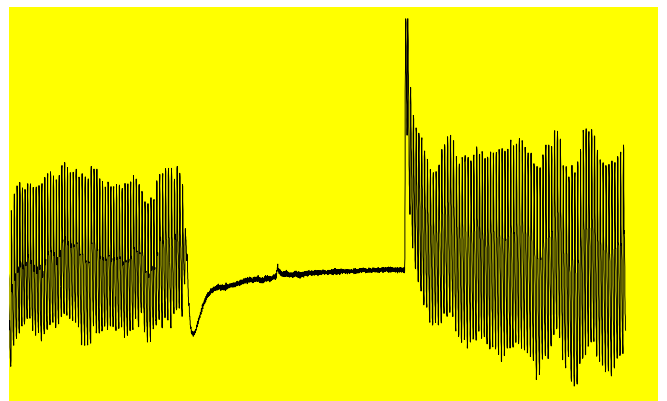
Для проведения окклюзионного теста с целью минимализации влияния системного изменения тонуса пальцевых артерий использовалась двухканальная

система регистрации фотоплетизмографического (ФП) сигнала, при этом с датчика на указательном пальце рабочей руки регистрировался основной сигнал, с датчика на указательном пальце другой руки - референсный. Оклюзионная проба выполнялась путем пережатия рабочей руки пациента при помощи манжеты, которая надувалась на 5 мин до давления, превышающего систолическое на 50 мм рт. ст. Быстрое снижение давления в манжете после окклюзии приводило к кратковременному повышению скорости кровотока в плечевой артерии.

Проведение анализа графика окклюзионной пробы с расчетом процента ПАС позволяет косвенно оценить ФЭ сосудов (рисунок 5). Анализ динамики пульсовой волны при окклюзионной пробе с расчетом % прироста ПАС позволяет косвенно оценить ФЭ сосудов. В норме наблюдается увеличение ПАС после окклюзии на 25%. Прирост ПАС менее 25% и/или снижение ПАС от исходного расценивается как нарушение ФЭ. Для минимализации влияния на результат внешних факторов исследование проводилось по стандартному протоколу.



**Рисунок 4. Прибор «Ангиоскан»**



**Рисунок 5. Окклюзионная проба (постокклюзионный прирост амплитуды сигнала)**

### **2.2.3.2. Исследование полиморфных маркеров генов – кандидатов атеросклероза**

#### **2.2.3.2.1. Реактивы и ферменты**

20 мкл реакционной смеси, включающей в себя 70 mM Трис-HCl, pH 8.8, 16.6 mM сульфата аммония, 0.01%-ного Твин-20, 2 mM хлорида магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров, 250 нМ флуоресцентных зондов, 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 50-100 нг геномной ДНК.

#### **2.2.3.2.2. Выделение геномной ДНК**

Выделение ДНК проводили из цельной венозной крови на автоматической станции QIAcube, с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit, США.

Генотипирование выполнено методом ПЦР в режиме реального времени, с использованием TaqMan зондов с детекцией генотипов с помощью флуоресценции «по конечной точке» на термоциклере “ABI StepOnePlus” (Applied Biosystems, программное обеспечение SDS версии 2.2., прикладной пакет программ Genotyping Analysis Software, Applied Biosystems, США.

Полиморфные маркеры исследуемых генов: рецептора, активируемого пролифератором пероксисом гамма (*PPARG2*), фактора некроза опухоли альфа (*TNFα*), аполипопротеина Е (*APOE*), печеночной липазы (*LIPC*), ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*), полипептида, транспортирующего органические анионы (*SLCO1B1*), представлены в таблице 1.

Таблица 1

## Полиморфные маркеры исследуемых генов

Ген	rs – регуляторная область гена	полиморфный маркер	Функциональная значимость
<i>PPARG</i> 2	1801, 282	<i>Pro12A</i> <i>la</i>	ген рецептора, активируемого пролифератором пероксисом гамма 2 - кодирует ядерный рецептор $\gamma$ , активация $PPAR\gamma$ индуцирует экспрессию многих генов липогенеза и ингибирование липолиза. Эти эффекты вызывают увеличение массы подкожного жира и снижение плазменного уровня ЖК, что в свою очередь повышает чувствительность тканей к инсулину, улучшает гликемический контроль
<i>APOE</i>	429358, 7412	<i>E2/E3/</i> <i>E4</i>	транспорт холестерина к тканям от мест его синтеза или всасывания
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	1800629	<i>G(308)</i> <i>A</i>	кодирует воспалительный цитокин $\alpha$ , полиморфизмы данного гена ассоциированы с ожирением и инсулино-резистентностью
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	361525	<i>G(238)</i> <i>A</i>	
<i>SLCO1B</i> <i>1</i>	4149056	<i>Val174</i> <i>Ala, *5</i>	Кодирует АТФ-связывающие белки-транслокаторы лекарственных средств
<i>ACE</i>	4646994	<i>I/D</i>	кодирует ангиотензин-превращающий фермент, катализирующий расщепление ангиотензина I до ангиотензина II
<i>LIPC</i>	1800588	<i>C514T</i>	является основным ферментом обмена ЛПВП, участвует в обратном транспорте ХС, синтезе ЛПНП и клиренсе постпрандиальных липидов

Забор крови. Венозную кровь в объеме 10 мл забирали в стерильные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта (1 объем раствора 0,5 М Na<sub>2</sub>-ЭДТА, pH 8,0 + 9 объемов крови). После тщательного перемешивания образцы помещались в морозильную камеру и хранились при -20°C до проведения анализа.

### 2.2.3.2.3. Амплификация ДНК

Амплификацию полиморфных маркеров проводили с помощью ПЦР «в реальном времени» на термоциклере “ABI StepOnePlus” (Applied Biosystems), в 20 мкл реакционной смеси, включающей в себя 70 мМ Трис-HCl, pH 8.8, 16.6 мМ сульфата аммония, 0.01%-ного Твин-20, 2 мМ хлорида магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров, 250 нМ флуоресцентных зондов, 1.5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 50-100 нг геномной ДНК.

Условия ПЦР и последовательности праймеров для амплификации исследованных локусов приведены в таблице 2.

**Таблица 2**

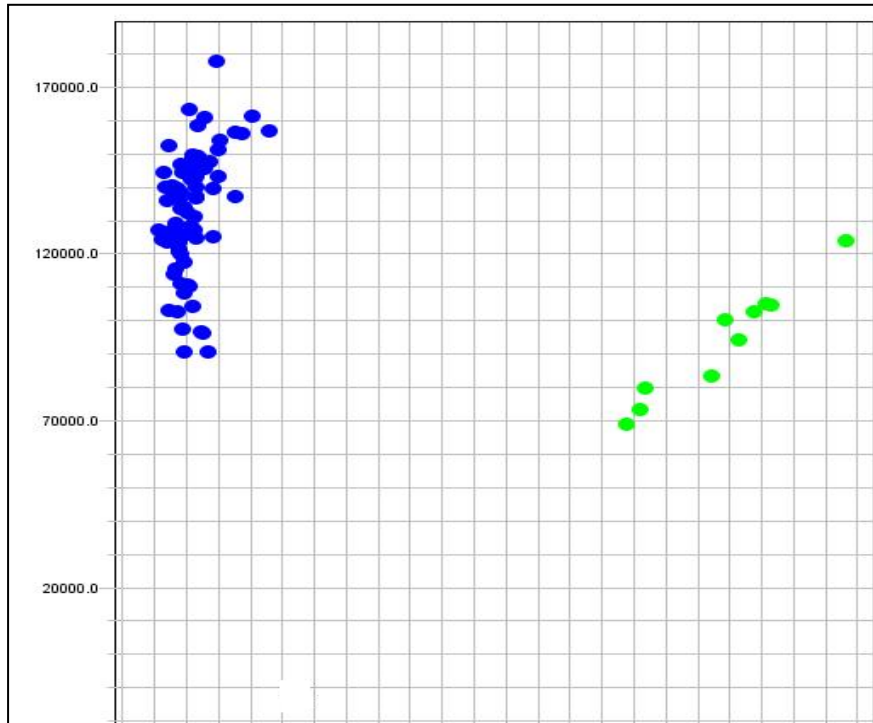
#### **Последовательности праймеров и особенности амплификации полиморфных участков генов**

Полиморфный маркер	Прямой и обратный праймеры (5' — 3')	Отжиг, °C
<i>PPARG2-12-FJL</i>	CATGCTGTTATGGGTGAAACTC	65.6
<i>PPARG2-12-RJL</i>	CAGACAGTGTATCAGTGAAGGAA	65,8
<i>PPARG2-12-FAML</i>	FAM- tcctAttGacCcaGaaagc–BHQ-1	68.8
<i>PPARG2-12-VICL</i>	VIC- tcctAttGacGcaGaaagc–BHQ-2	69.7
<i>TNFA-308-FJL</i>	CTGTCTGGAAGTTAGAAGG	60.3
<i>TNFA-308-RJL</i>	GACTGATTTGTGTGTAGGA	60.3

<i>TNFA-308-FAML</i>	FAM- ccGtCcCcAtGcc -BHQ-1	70.9
<i>TNFA-308-VICL</i>	VIC- ccGtCcTcAtGcc -BHQ-2	66.8
<i>APOE-112-FJ</i>	CTGTCCAAGGAGCTGCA	65.3
<i>APOE-112-RJ</i>	AGGTCATCGGCATCGC	65.5
<i>APOE-112-FAM</i>	FAM- aggacgTgCgCgg -BHQ-1	73.8
<i>APOE-112-VIC</i>	VIC- aggacgTgTgCggc -BHQ-2	73.7
<i>APOE-158-FJ</i>	GCGTAAGCGGCTCCTC	66.2
<i>APOE-158-RJ</i>	CTCCTGTAGCGGCTGG	65.1
<i>APOE-158-FAM2</i>	FAM- tgcagaAgCgcctggc -BHQ-1	74.1
<i>APOE-158-VIC2</i>	VIC- tgcagaAgTgcctggc -BHQ-2	70.7
<i>SLCO1B1-rs4149056-FJ</i>	GGTTGTTTAAAGGAATCTG	57.3
<i>SLCO1B1-rs4149056-RJ</i>	AGCGAAATCATCAATGTA	57.4
<i>SLCO1B1-rs4149056-FAM</i>	FAM- tggatatatgCgttcattgggt –BHQ-1	66.6
<i>SLCO1B1-rs4149056-VIC</i>	VIC- tggatatatgTgttcattgggt –BHQ-2	63.8
<i>LIPC-rs1800588-FJ</i>	CTCTCAATGGGTCACTTG	60.8
<i>LIPC-rs1800588-RJ</i>	GGGTCCAAATTTCTGTTG	59.7
<i>LIPC-rs1800588-FAM</i>	FAM- ttttgacaCggggggtga –BHQ-1	66.4
<i>LIPC-rs1800588-VIC</i>	VIC- ttttgacaTggggggtga –BHQ-2	63.4
<i>TNFA-238-FJL</i>	CCTACACACAAATCAGTCA	60.6
<i>TNFA-238-RJL</i>	CAAGCATCAAGGATACCC	61.0
<i>TNFA-238-FAML</i>	FAM- ctGcTcCgAtTccg -BHQ-1	68.7
<i>TNFA-238-VICL</i>	VIC- ctGcTcTgAtTccg -BHQ-2	64.9

#### 2.2.3.2.4. Идентификация полиморфизмов исследуемых генов

Детекция генотипов выполнялась методом флуоресценции «по конечной точке» на термоциклере “ABI StepOnePlus” (Applied Biosystems, программное обеспечение SDS версии 2.2., прикладной пакет программ Genotyping Analysis Software, Applied Biosystems, США) (рисунок 6).



**Рисунок 6. Метод детекции флуоресценции «по конечной точке» полиморфного маркера *G(308)A* гена *TNFα***

### **2.3. Статистическая обработка результатов**

Расчеты были выполнены с использованием непараметрических методов статистики, посредством SPSS Statistics, v.10.0 (SPSS Inc., США).

Описательные статистические данные в работе представлены в виде: медианы и 25-го, 75-го перцентилей [25%;75%] и % соотношения в группе.

Нулевой гипотезой считается предположение об отсутствии различий между группами, альтернативной – об их наличии.

Уровень значимости для всех проверяемых гипотез был принят как  $p < 0,05$ .



### **2.3.1. Статистическая обработка результатов одномоментного исследования**

Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных маркеров в группах с наличием и отсутствием заболевания нами использовался критерий  $\chi^2$ .

Распределение частот генотипов по всем полиморфизмам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга.

В исследованиях типа «случай-контроль» относительный риск развития заболевания оценивается с помощью показателя соотношения шансов (odds ratio, OR).

Для сравнения частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфных маркеров в группах с наличием и отсутствием заболевания нами использовался критерий  $\chi^2$ . Распределение частот генотипов по всем полиморфизмам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. В исследованиях типа «случай-контроль» относительный риск развития заболевания оценивается с помощью показателя соотношения шансов (odds ratio, OR). Значение OR вычисляли с помощью программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях "случай-контроль"». Доверительный интервал (ДИ/CI, confidence interval) представляет собой интервал значений, в пределах которого с вероятностью 95 % находится ожидаемое значение рассматриваемого параметра; в данном случае, значение OR. OR является статистически значимым, если 95% ДИ для отношения шансов не включает единицу [125, 126].

### **2.3.2. Статистическая обработка результатов проспективного фармакогенетического исследования**

Статистический анализ распределения частот аллелей и генотипов проводили с использованием критерия  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ .

Статистическую значимость различий показателей до и на фоне терапии оценивали с помощью парного критерия Вилкоксона, а в разных группах (в зависимости от генотипа) – с помощью критериев Манна-Уитни (для 2х групп) и Краскела-Уоллиса (для 3ех групп).

### **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Настоящая работа включала 2 раздела: одномоментное исследование и проспективное открытое исследование фармакогенетической эффективности статинов.

Результаты первого раздела диссертационной работы основаны на данных комплексного клинико-лабораторного обследования 237 больных СД2. Отобранные для исследования пациенты были разделены на две группы в зависимости от наличия/отсутствия сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ): 1. «ССЗ-» [n=101], 2. «ССЗ+» [n=136]. Наличие у испытуемых ССЗ определялось по наличию и/или ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда (ИМ), острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), периферического атеросклероза - артерий нижних конечностей и/или сонных артерий более 50%.

Результаты второй части диссертационной работы основаны на данных комплексного клинико-лабораторного обследования в динамике: до начала исследования и через 12 мес., 122 пациентов с СД2 и дислипидемией, которым впервые назначена терапия статинами.

#### **3.1. Результаты ретроспективного исследования**

##### **3.1.1. Клиническая характеристика общей группы пациентов**

Было обследовано 237 больных СД2, отобранных в исследование, согласно критериям включения, не включения (см. раздел «материалы и методы»).

Клиническая характеристика общей группы пациентов представлена в таблице 3. Медиана возраста пациентов составила – 65,1 года, что укладывается в средний возрастной интервал пациентов с СД2, так половина пациентов с СД2 старше 65 лет. Количество женщин в группе превалировало, это соответствовало тому факту, что у женщин СД2 встречается чаще, чем у мужчин. Присутствовали пациенты преимущественно с избыточной массой тела (ИМТ = 31,2), наличием АГ и с дислипидемией, что позволяет предполагать развитие у таких больных СД2 на фоне инсулинорезистентности в рамках классического метаболического синдрома.

Таблица 3

**Клиническая характеристика пациентов с СД2 (n=237)**

Клинические параметры	Значение
Пол (мужчины/женщины) %	29/70
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	31,2 [25,9;33,6]
Возраст, лет	65,1 [57,2;72,3]
Продолжительность СД2 типа, лет	16 [9,6;18,5]
Статус курения, %	20,3
HbA1c, %	7,8 [7,2;9,3]
Наследственность по ССЗ, %	26,1
Наличие артериальной гипертензии (АГ), %	85,3
Длительность АГ, лет	7 [3;15]
Систолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (САД)	145 [130;150]
Диастолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (ДАД)	85 [75;90]
Терапия препаратами, блокирующими ренин-ангиотензиновую систему (РАС), %	86,9
Терапия иАПФ% / БРА%	52/48

Данные представлены: Ме [25 перцентиль; 75 перцентиль], %

Большинство больных получали комплексную терапию, направленную на снижение сердечно-сосудистого риска, статины и антигипертензивную терапию, в том числе препаратами иАПФ/БРА, которые обладают нефропротективным эффектом у пациентов с СД2. Тем не менее, у части пациентов было выявлено поражение одного или нескольких сосудистых бассейнов при относительно небольшой длительности диабета: медиана-7 лет, а у других отмечалось длительное отсутствие ССЗ: медиана-20 лет. С целью выявления возможных генетических причин таких различий были изучены и сопоставлены группы пациентов с наличием и отсутствием ССЗ.

### 3.1.2. Клиническая характеристика групп «ССЗ+», «ССЗ-»

Пациенты с наличием и отсутствием ССЗ были сопоставимы по основным клиническим параметрам: полу, возрасту, ИМТ, уровням систолического и диастолического артериального давления (САД и ДАД, соответственно), показателям липидного профиля (уровням ХС, ЛПНП, ЛПВП, ТГ). Отличия групп определялись только изначально заданными в критериях включения/исключения параметрами: длительностью СД2 и наличием ССЗ. Клиническая характеристика групп «ССЗ-» и «ССЗ+» представлены в таблице 4.

**Таблица 4**

#### **Клиническая характеристика групп с наличием и отсутствием ССЗ**

Клинические параметры	237 пациентов с СД2		
	ССЗ+ (n=136)	ССЗ-(n=101)	p
Пол (мужчины/женщины) %	32/68	25/75	н/д
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	31,6 [26,2; 34,9]	29,7 [24,9; 33,9]	н/д
Возраст, лет	62,0 [54,7;	67,0 [61,0;	н/д

	70,0]	75,0]	
Продолжительность СД2, лет	7,0 [2,5; 10,0]	20,0 [15,0; 24,0]	<0,05
Статус курения, %	21,8	18,8	н/д
HbA1c, %	7,8 [7,2; 9,3]	8,2 [7,5; 9,2]	н/д
Уровень холестерина (ХС), ммоль/л	6,00 [4,40; 6,58]	5,59 [4,36; 6,19]	н/д
Уровень липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л	4,10 [2,45; 4,60]	4,21 [3,38; 4,71]	н/д
Уровень триглицеридов (ТГ), ммоль/л	1,87 [1,40; 2,28]	1,73 [1,28; 2,28]	н/д
Уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), ммоль/л	1,12 [0,96; 1,20]	1,17 [0,90; 1,43]	н/д
Наследственность по ССЗ, %	30,6	20	н/д
Наличие артериальной гипертензии (АГ), %	86,8	83,3	н/д
Длительность АГ, лет	5 [3; 17]	8 [3; 14]	н/д
Систолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (САД)	145 [135; 150]	140 [130; 145]	н/д
Диастолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (ДАД)	85 [80; 90]	80 [75; 90]	н/д
Терапия АГ, %	80,3	78,6	н/д
Терапия препаратами, блокирующими ренин-ангиотензиновую систему (РАС), %	86,7	87,3	н/д
Терапия иАПФ% / БРА%	51/49	52/48	н/д
СКФ по MDRD, мл/мин/1,73м <sup>2</sup>	97 [75; 113]	102 [78; 132]	н/д

Данные представлены: Ме [25 перцентиль; 75 перцентиль], %

В группу «ССЗ-» (n= 101) были отобраны пациенты с длительностью СД2 более 15 лет и отсутствием, по данным анамнеза и медицинской карты, ССЗ, определенных как и/или ИБС, ИМ, ОНМК, атеросклероз артерий нижних конечностей и/или сонных артерий более 50%.

В группе «ССЗ+» (n= 136) находились пациенты с СД2 длительностью менее 10 лет и наличием в анамнезе одного или более из указанных выше ССЗ (таблица 5). Такое разделение на группы было сделано для наибольшей вероятности выявления генетического компонента в условиях многофакторности сердечно-сосудистой патологии.

**Таблица 5**

**Распределение сердечно-сосудистых осложнений в группе ССЗ+**

<b>ССЗ</b>	<b>Значение</b>
ИМ, %	28,0
ИБС, %	65,9
ОНМК, %	22,69
ЦВБ, %	24,89
атеросклероз БЦА, %	40,3
атеросклероз артерий нижних конечностей, %	36,2

**3.1.3. Распределение генотипов в группах с наличием и отсутствием ССЗ**

При сопоставлении данных групп «ССЗ+» и «ССЗ-» не было выявлено различий в распределении генотипов ни по одному из семи исследуемых полиморфных маркеров (таблица 6).

Также не было выявлено достоверных различий при сопоставлении распределения генотипов группы «ССЗ-» с распределением генотипов тех пациентов из группы «ССЗ+», которые имели несколько сердечно-сосудистых осложнений.

Таблица 6

**Распределение генотипов исследуемых полиморфных маркеров  
в группах ССЗ+ и ССЗ-**

Генотип	Количество генотипов в группах		p
	ССЗ+	ССЗ-	
<i>PPARG2</i>			н/д
<i>Pro/Pro</i>	111	74	
<i>Pro/Ala</i>	20	23	
<i>Ala/Ala</i>	5	4	
<i>APOE</i>			н/д
<i>E4/E4</i>	2	1	
<i>E4/E2</i>	1	2	
<i>E3/E2</i>	16	15	
<i>E3/E4</i>	26	21	
<i>E3/E3</i>	91	62	
<i>E2/E2</i>	-	-	
<i>TNF-α (308)</i>			н/д
<i>GG</i>	35	19	
<i>GA</i>	101	82	
<i>AA</i>	-	-	
<i>TNF-α (238)</i>			н/д
<i>GG</i>	118	85	
<i>GA</i>	18	16	
<i>AA</i>	-	-	
<i>SLCO1B1</i>			н/д
<i>ValVal</i>	116	87	
<i>ValAla</i>	15	11	
<i>AlaAla</i>	5	3	



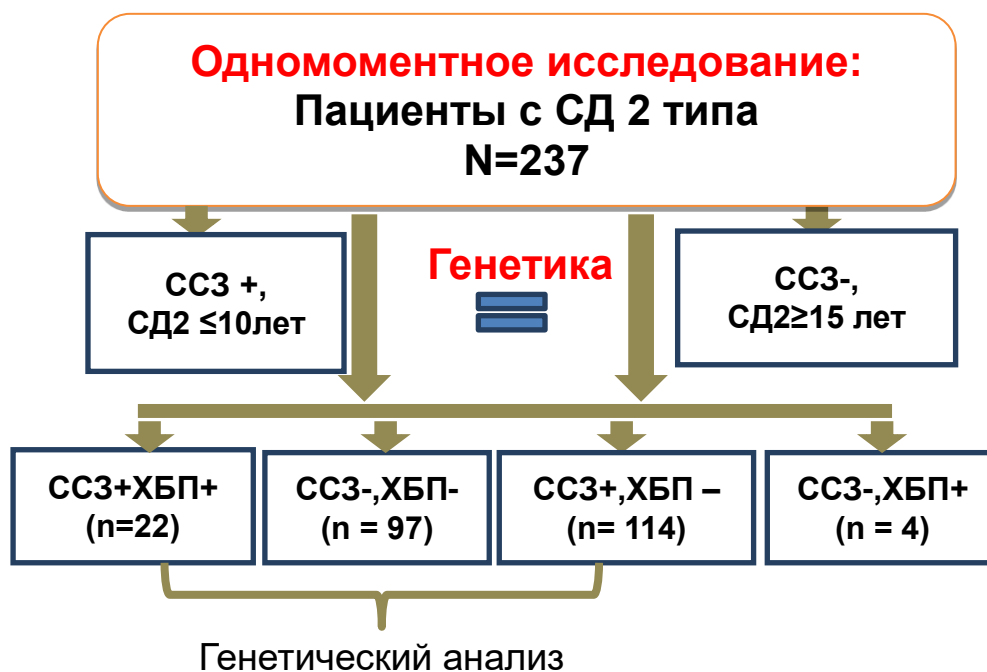
<i>ACE</i>			н/д
<i>II</i>	34	23	
<i>ID</i>	72	58	
<i>DD</i>	30	20	
<i>LIPC</i>			н/д
<i>CC</i>	87	59	
<i>CT</i>	45	36	
<i>TT</i>	4	6	

Таким образом, полиморфные маркеры генов - кандидатов развития атеросклероза: *Pro12Ala* гена *PPARG2*, *G(-308)A* гена *TNF- $\alpha$* , *G(-238)A* гена *TNF- $\alpha$* , *E2/E3/E4* гена *APOE*, *I/D* гена *ACE*, *C-514T* гена *LIPC*, *SLCO1 B1\*5* гена *SLCO1 B1*, не показали достоверной ассоциации с развитием сердечно-сосудистых осложнений: ИБС, инфаркта миокарда, ОНМК, атеросклероза артерий нижних конечностей или атеросклероза сонных артерий более 50%, у пациентов с СД2.

После сопоставления групп с наличием и отсутствием ССЗ был внесен дополнительный критерий отбора – наличие/отсутствие ХБП у пациентов (рисунок 7).

Такое разделение было сделано с целью выделения групп с максимальным сердечно-сосудистым риском, поскольку ХБП признана как независимый фактор риска сердечно-сосудистой патологии и эквивалент ИБС.

Наличие ХБП оценивалось как стойкое снижение скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1.73м<sup>2</sup>, когда данный диагноз устанавливается вне зависимости от других маркеров поражения почек.



**Рисунок 7. Разделение на группы после внесения ХБП как дополнительного критерия сердечно-сосудистого риска**

### **3.1.4. Клиническая характеристика групп с наличием и отсутствием сердечно-сосудистых заболеваний и хронической болезни почек**

При разделении общей группы 237 пациентов в зависимости от наличия и отсутствия ССЗ и ХБП получили 4 группы: «ХБП+ ССЗ+» (n=22), «ХБП – ССЗ-» (n = 97), «ХБП- ССЗ+» (n= 114), «ХБП+ ССЗ-» (n= 4).

Группа «ХБП+ ССЗ-» не включалась в дальнейший анализ распределения генотипов ввиду малой численности.

Группы «ССЗ+ХБП+», «ССЗ-ХБП-» и «ССЗ+ХБП-» были сопоставимы по основным клиническим показателям. Клиническая характеристика данных групп представлена в таблице 7.

Отличия групп так же, как в случае групп «ССЗ+» и «ССЗ-», определялись только изначально заданными в критериях включения/исключения параметрами: длительностью СД2, наличием ССЗ и ХБП.

Распределение сердечно-сосудистых осложнений в группах ССЗ+ с наличием и отсутствием ХБП представлено в таблице 8.

Таблица 7

**Клиническая характеристика групп с наличием и отсутствием сердечно-сосудистых заболеваний и хронической болезни почек**

Клинические параметры	233 пациента с СД2			
	ХБП+ССЗ+ (n=22)	ХБП-ССЗ- (n=97)	ХБП-ССЗ+ (n= 114)	p
Пол (мужчины/женщины) %	32/68	25/75	31/69	н/д
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	32,0 [25,7; 34,4]	29,7 [24,9; 33,9]	31,4 [26,9; 35,9]	н/д
Возраст, лет	63,5 [62,3; 71,0]	67,0 [61,0; 75,0]	61,5 [53,0; 69,5]	н/д
Продолжительность СД2, лет	8,0 [2,0; 10,0]	20,0 [15,0; 24,0]	6,0 [3,0; 10,0]	<0,05
Наследственность по СД2, %	38,4	35,1	33,3	н/д
Статус курения, %	20,4	18,8	22,1	н/д
HbA1c, %	8,0 [7,3; 9,5]	8,2 [7,5; 9,2]	7,8 [7,2; 9,2]	н/д
Уровень гемоглобина, г/л	129 [120; 143]	135 [126; 143]	131 [119; 147]	н/д
Уровень холестерина, ммоль/л	5,78 [4,36; 6,20]	5,59 [4,36; 6,19]	6,07 [4,40; 6,60]	н/д
Уровень ЛПНП, ммоль/л	3,96 [3,30; 4,60]	4,21 [3,38; 4,71]	4,14 [2,44;	н/д

			4,62]	
Уровень ТГ, ммоль/л	1,90 [1,35; 2,30]	1,73 [1,28; 2,28]	1,87 [1,50; 2,27]	н/д
Уровень ЛПВП, ммоль/л	1,10 [0,89; 1,33]	1,17 [0,90; 1,43]	1,13 [0,98; 1,15]	н/д
Наследственность по ССЗ, %	26,0	20	33,5	н/д
Наличие артериальной гипертензии (АГ), %	88,4	83,3	86,5	н/д
Длительность АГ, лет	7 [2; 15]	10 [3; 19]	4 [3; 17]	н/д
Систолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (САД)	146 [140; 155]	140 [130; 145]	140 [130; 150]	н/д
Диастолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (ДАД)	81 [75; 92]	80 [78; 90]	80 [80; 90]	н/д
Терапия препаратами, блокирующими ренин- ангиотензиновую систему (РАС), %	77,9	70,3	74,1	н/д
СКФ по MDRD, мл/мин/1,73м2	44 [34; 59]	102 [78; 132]	106 [81; 125]	<0,0 5

н/д–недостаточно,  $p \geq 0,05$ . Данные представлены: Ме [25 процентиль; 75 процентиль], %

Таблица 8

**Распределение сердечно-сосудистых осложнений в группах ССЗ+ с  
наличием и отсутствием ХБП**

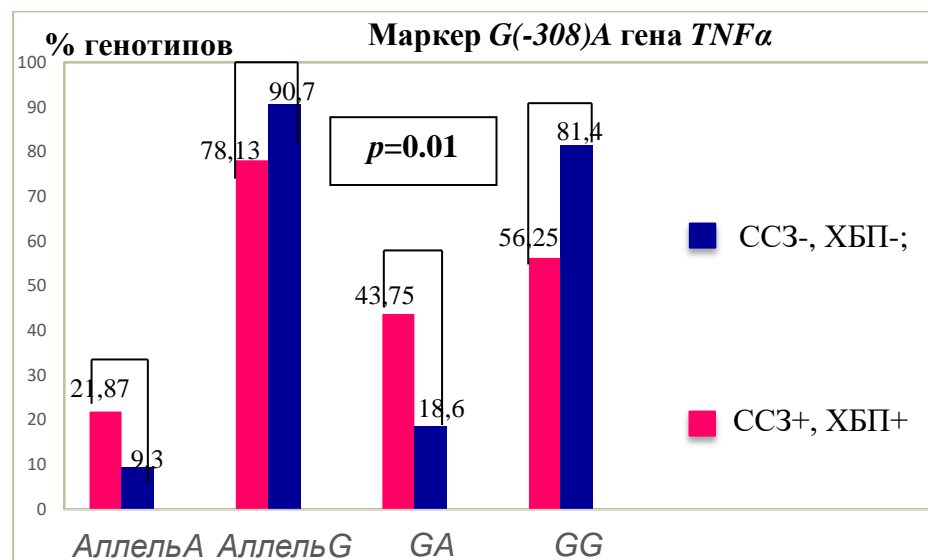
ССЗ	ХБП+ ССЗ+ (n=22)	ХБП- ССЗ+ (n= 114)	p
-----	---------------------	-----------------------	---

ИМ, %	23,5	28,9	н/д
ИБС, %	66,5	65,8	н/д
ОНМК, %	29,4	21,4	н/д
ЦВБ, %	31,1	23,7	н/д
атеросклероз БЦА, %	42,9	39,8	н/д
атеросклероз артерий нижних конечностей, %	34,7	36,5	н/д

### 3.1.5. Результаты генетического исследования для групп «ССЗ+ХБП+», «ССЗ-ХБП-» и «ССЗ+ХБП-»

При анализе распределения аллелей и генотипов из 7-ми исследованных полиморфных генетических маркеров достоверные различия между группами показал маркер *G(308)A* гена *TNF-α*: в группе ««ХБП-, ССЗ-» отмечалось достоверно более высокая частота аллеля *G* и генотипа *GG*, в группе «ССЗ+ХБП+» - накопление аллеля *A* и генотипа *GA* (рисунок 8).

Таким образом, носительство аллеля *G* и генотипа *GG* оказывало протективное влияние на риск сочетанного развития ССЗ и ХБП: OR=0,35; ДИ 95% (0,10-0,89),  $p=0,02$  и OR=0,29; ДИ 95% (0,10-0,89),  $p=0,02$ , соответственно. В свою очередь, носительство аллеля *A* и генотипа *GA* повышало риск развития нефрокардиального синдрома с OR=2.88 и OR=1,77, соответственно.



**Рисунок 8. Распределение маркера *G(-308)A* гена *TNF-α* в группах с наличием ХБП, ССЗ и без осложнений**

Таким образом, ассоциации риска сердечно-сосудистых осложнений (ИМ, ОНМК, периферического атеросклероза сосудов) у пациентов с СД2 с полиморфизмом генов, кодирующих факторы развития атеросклероза, выявлено не было, что может указывать на большее значение в развитии ССЗ негенетических факторов риска.

Установлено, что риск сочетанного развития ССЗ и ХБП у больных СД2 ассоциирован с полиморфизмом *G(-308)A* гена *TNF-α*.

Известно, что ген *TNF-α* кодирует один из самых мощных цитокинов, индуцирующих процессы воспаления органов и тканей, в том числе сосудистой стенки. По данным литературы, полиморфизм данного гена ассоциирован с повышением концентрации провоспалительного цитокина *TNF-α* в крови, что может способствовать более выраженному повреждению сосудистого русла,

Опираясь на указанные сведения, можно предполагать, что полученная ассоциация отражает значимое участие процессов воспаления в генезе нефрокардиального синдрома.

## 3.2. Результаты проспективного исследования

### 3.2.1. Клиническая характеристика общей группы пациентов

Результаты второй части диссертационной работы основаны на данных комплексного клинико-лабораторного обследования в динамике: до начала исследования и через 12 мес., 122 пациентов с СД2 и дислипидемией, которым впервые назначена терапия статинами.

В ходе исследования 25 человек выбыли (9 человек прекратили прием препарата вне связи с медицинскими показаниями, 13 человек не смогли приехать на динамический контроль, у 2-х человек развилась миалгия на фоне приема статинов, у одного отмечалось повышение печеночных трансаминаз более 2,5 норм), таким образом, завершили протокол исследования 97 пациентов.

Клиническая характеристика данных пациентов представлена в таблице 9.

**Таблица 9**

**Клиническая характеристика пациентов проспективного исследования до начала и через 12 мес терапии статинами, n=97**

Клинические параметры	До начала терапии	Через 12 месяцев лечения	p
Пол (мужчины/женщины) %	23% /77%	23% /77%	н/д
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	32,0 [28,0;33,7]	31,9 [28;33,7]	н/д
Возраст, лет	64 [55;69]	65 [56;70]	н/д
Продолжительность СД2 типа, лет	9,0 [7,5;13,0]	10,0	н/д

		[8,4;14,1]	
Статус курения, %	13,8	13,8	н/д
HbA1c, %	8,2 [7,1;10,0]	8,0 [6,9;10,0]	н/д
Наследственность по ССЗ, %	35	35	н/д
Наличие артериальной гипертензии (АГ), %	84,5	84,5	н/д
Длительность АГ, лет	7,0 [3,0;15,0]	8,0 [3,9;16,1]	н/д
Систолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (САД)	146 [130;150]	140 [130;150]	н/д
Диастолическое артериальное давление, мм.рт.ст. (ДАД)	85[75;90]	85 [70;90]	н/д
Терапия препаратами, блокирующими ренин-ангиотензиновую систему (РАС), %	86,9	86,9	н/д
Терапия иАПФ% / БРА%	52/48	52/48	н/д

<sup>1</sup> – н/д – недостоверно; данные представлены: Ме [25 перцентиль; 75 перцентиль] %

Медиана возраста пациентов составила 64 года, это не противоречит тому факту, что половина пациентов с СД2 старше 65 лет. Соотношение мужчин и женщин в группе: 3,34 (женщины/мужчины), несколько превышало соотношение женщин и мужчин с СД2 в России: 2,5.

Присутствовали пациенты преимущественно с избыточной массой тела и ожирением (медиана ИМТ =32 кг/м<sup>2</sup>), наличием АГ и дислипидемии, что позволяет предполагать развитие у таких больных СД2 на фоне инсулинорезистентности в рамках классического метаболического синдрома. Медина уровня гликированного гемоглобина составила 8,2% и соответствовала заданным в критериях включения условиям: < 10,0 %.



### 3.2.2. Анализ показателей липидного обмена

Исходно показатели липидного спектра крови исследуемых пациентов соответствовали типичным при СД2 атерогенным нарушениям, через 12 месяцев терапии статинами отмечалось снижение уровней ХС, ЛПНП и ТГ, достигавшее статистической значимости для ХС и ТГ. Статистически достоверных различий по уровню HbA1c и ИМТ выявлено не было. Динамика показателей липидного спектра и HbA1c до и через 12 месяцев терапии представлена в таблице 10.

**Таблица 10**

**Динамика показателей липидного спектра и HbA1c до и через 12 месяцев терапии, n=97**

Клинические параметры	Исходно	Через 12 мес терапии	p
HbA1c, %	8,2 [7,1;10,0]	8,0 [6,9;10,0]	н/д <sup>1</sup>
ХС, ммоль/л	5,88 [4,60;6,30]	5,25 [4,55; 6,30]	<0,05
ЛПНП, ммоль/л	3,78 [2,80; 4,00]	3,09 [2,80; 3,58]	н/д
ТГ, ммоль/л	2,12 [1,60; 3,50]	1,63 [1,60; 2,18]	<0,05
ЛПВП, ммоль/л	1,05 [0,88; 1,30]	1,11 [0,91; 1,28]	н/д

<sup>1</sup> – н/д – недостоверно; данные представлены: Ме [25 перцентиль; 75 перцентиль] %

Исходно пациенты с различными вариантами генотипа исследуемых генов были сопоставимы по показателям липидного обмена и параметрам ФЭ, а также основным клиническим показателям: полу, возрасту, ИМТ, длительности СД2, уровню HbA1c. Базальные значения уровня ХС, ЛПНП и ТГ до начала терапии в зависимости от распределения генотипов в группе (n=97) представлены в таблице 11.

Таблица 11

**Исходные показатели липидного профиля до начала терапии в  
зависимости от генотипа исследуемых генов**

Геноти п	Уровни липидов, ммоль/л			р
	ХС	ЛПНП	ТГ	
<i>PPARG2</i>				н/д
<i>Pro/Pro</i>	6,17 [4,71; 6,81]	4,00 [2,90; 4,02]	2,16 [1,85; 2,77]	
<i>Pro/Ala</i>	6,42 [5,66; 7,08]	4,25 [2,76; 4,59]	1,70 [1,65; 3,45]	
<i>Ala/Ala</i>	6,06 [4,70; 6,50]	4,28 [2,81; 4,40]	2,56 [1,80; 2,90]	
<i>APOE</i>				н/д
<i>E4/E4</i>	4,94 [4,80; 6,30]	4,02 [3,08; 4,55]	2,10 [1,70; 2,80]	
<i>E4/E2</i>	4,50 [4,60; 6,60]	4,21 [2,86; 4,57]	2,15 [1,75; 2,79]	
<i>E3/E2</i>	4,85 [4,71; 6,80]	3,75 [2,80; 4,60]	2,00 [1,65; 2,56]	
<i>E3/E4</i>	5,51 [4,07; 5,84]	3,25 [2,08; 4,23]	2,13 [1,75; 2,75]	
<i>E3/E3</i>	6,14 [5,68; 6,89]	3,90 [3,23; 4,49]	2,07 [1,66; 2,80]	
<i>E2/E2</i>	-	-	-	
<i>TNF-α (308)</i>				н/д
<i>GG</i>	6,08 [5,39; 6,89]	3,98 [3,23; 4,28]	2,18 [1,55; 2,54]	
<i>GA</i>	5,58 [4,43; 5,88]	3,17 [2,19; 3,78]	2,19 [1,78; 2,52]	
<i>AA</i>	-	-	-	
<i>TNF-α (238)</i>				н/д
<i>GG</i>	6,00 [4,70; 6,51]	3,78 [3,30; 4,30]	1,98 [1,85; 2,85]	
<i>GA</i>	6,03 [4,69; 6,80]	3,88 [3,31; 3,98]	2,56 [2,21; 2,61]	
<i>AA</i>	-	-	-	
<i>SLCO1B1</i>				н/д
<i>ValVal</i>	5,89 [4,80; 6,00]	3,88 [3,13; 4,35]	2,01 [1,57; 2,65]	
<i>ValAla</i>	5,87 [4,50; 6,50]	4,05 [2,81; 4,56]	1,80 [1,70; 2,66]	
<i>AlaAla</i>	4,97 [4,50; 6,60]	3,57 [2,70; 4,60]	1,91 [1,60; 2,69]	
<i>ACE</i>				н/д
<i>I/I</i>	4,98 [4,50; 6,10]	3,47 [2,40; 4,10]	1,93 [1,49; 2,66]	
<i>I/D</i>	5,18 [4,66; 6,70]	3,55 [2,60; 4,10]	2,04 [1,50; 2,46]	
<i>D/D</i>	4,75 [4,50; 6,60]	3,35 [2,30; 3,90]	2,00 [1,60; 2,30]	
<i>LIPC</i>				н/д

<i>CC</i>	6,05 [5,16; 6,86]	3,67 [3,06; 4,38]	2,50 [1,51; 3,45]	
<i>CT</i>	5,51 [4,50; 6,80]	3,25 [2,19; 4,02]	1,87 [1,45; 2,52]	
<i>TT</i>	6,43 [4,60; 6,30]	3,78 [3,01; 4,45]	2,06 [1,59; 2,60]	

<sup>1</sup> – н/д – недостоверно; данные представлены: Ме [25 перцентиль; 75 перцентиль] %

Через 12 месяцев терапии были выявлены статистически значимые различия в % снижения уровня липидов в зависимости от генотипа 2-х полиморфных маркеров изученных нами генов: *Pro12Ala* гена *PPARG2* и *E2/E3/E4* гена *APOE*.

### 3.2.2.1.Эффективность терапии статинами в зависимости от полиморфизма *Pro12Ala* гена *PPARG2*

За период терапии (12 месяцев) выявлены достоверные различия в снижении уровня ХС и ЛПНП в зависимости от полиморфизма гена *PPARG2* (таблица 12 и таблица 13).

Так, выявлено достоверно большее снижение ХС и ЛПНП у носителей генотипа *Pro/Pro* гена *PPARG2* по сравнению с носителями *Pro/Ala* и *Ala/Ala*: % снижения ХС: - 20.74% против - 4.6% и - 5.61%, соответственно,  $p = 0.04$ ; % снижения ЛПНП: -26.00% против - 6.11% и - 7.32 %; соответственно,  $p = 0.029$  (рисунок 9).

**Таблица 12**

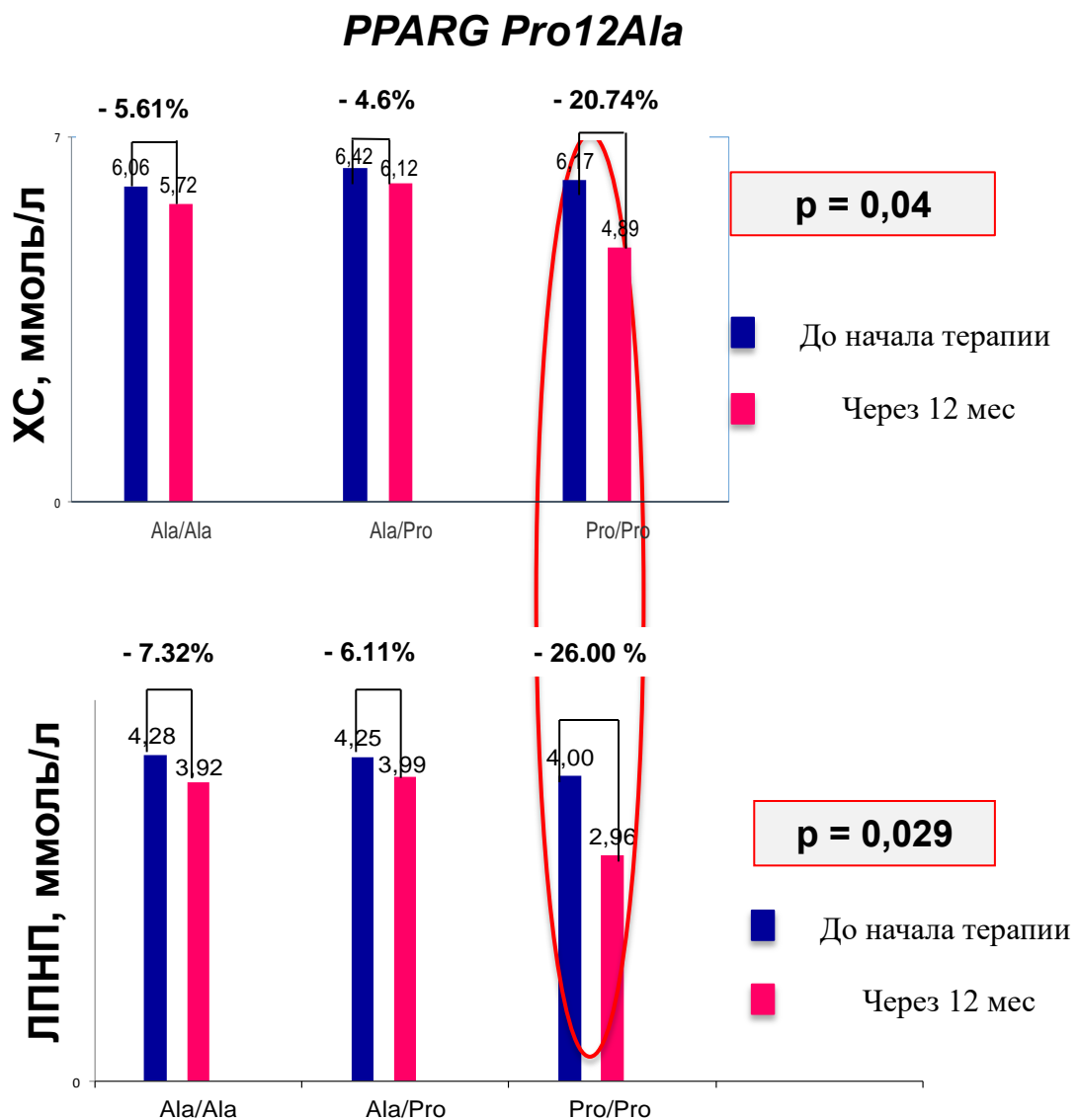
#### Динамика уровня ХС в зависимости от генотипа *Pro12Ala* гена *PPARG2*

Генотипы <i>PPARG2</i>	$\Delta$ ХС, %	p
<i>Pro/Pro</i>	- 20.74	0,04
<i>Ala/Pro</i>	- 4.6	
<i>Ala/Ala</i>	- 5.61	

Таблица 13

Динамика уровня ЛПНП в зависимости от генотипа *Pro12Ala* гена *PPARG2*

Генотипы <i>PPARG2</i>	$\Delta$ ЛПНП, %	p
<i>Pro/Pro</i>	-26.00	0,029
<i>Ala/Pro</i>	- 6.11	
<i>Ala/Ala</i>	- 7.32	

Рисунок 9. Динамика уровня ХС (а) и ЛПНП (б) на терапии статинами в зависимости от полиморфизма *Pro12Ala* гена *PPARG2*

### 3.2.2.2. Эффективность терапии статинами в зависимости от полиморфизма *E2/E3/E4* гена *APOE*

За период терапии (12 месяцев) выявлены достоверные различия в снижении уровня ХС и ТГ в зависимости от полиморфизма *E2/E3/E4* гена *APOE* (таблица 14 и таблица 15).

Таблица 14

Динамика уровня холестерина в зависимости от полиморфизма *E2/E3/E4* гена *APOE*

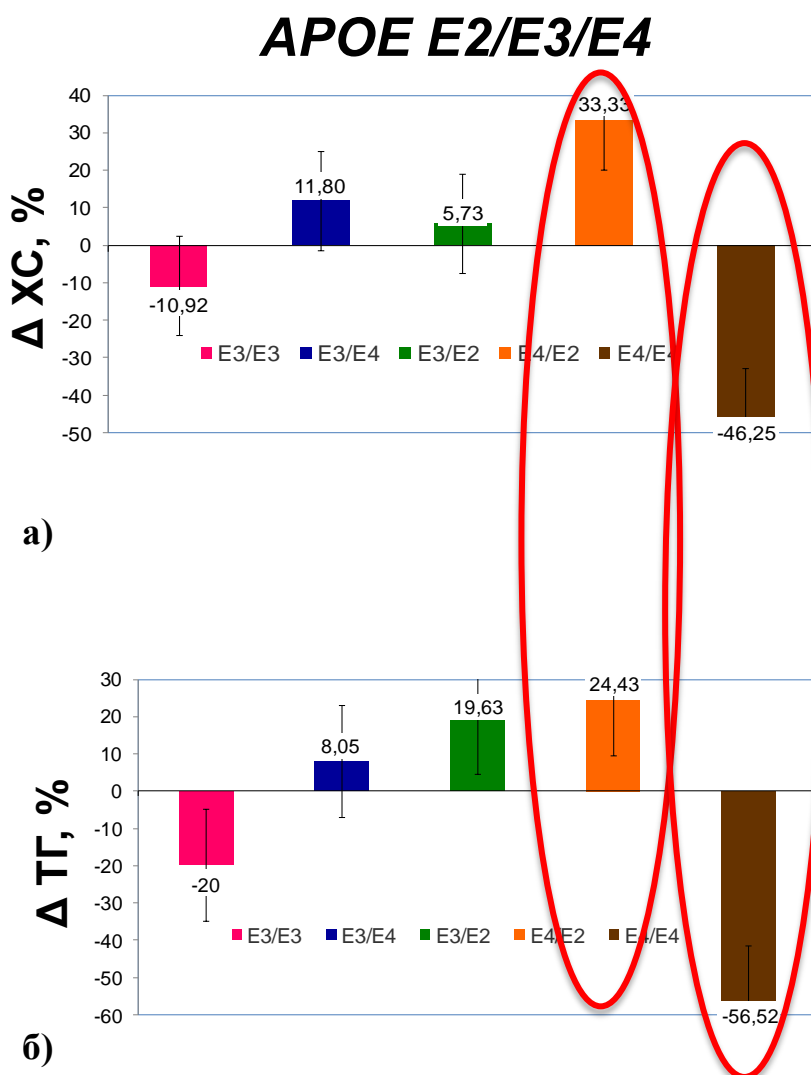
Генотипы <i>APOE</i>	$\Delta$ ХС, %	p
<i>E4/E4</i>	- 46,25	0,01
<i>E4/E2</i>	+ 33,33	
<i>E3/E2</i>	+ 5,73	
<i>E3/E4</i>	+ 11,80	
<i>E3/E3</i>	-10,92	

Таблица 15

Динамика уровня триглицеридов в зависимости от полиморфизма *E2/E3/E4* гена *APOE*

Генотипы <i>APOE</i>	$\Delta$ ТГ, %	p
<i>E4/E4</i>	-56,52	0,03
<i>E4/E2</i>	+ 24,43	
<i>E3/E2</i>	+ 19,63	
<i>E3/E4</i>	+ 8,05	
<i>E3/E3</i>	-20,00	

У пациентов с генотипами *E4/E4* и *E3/E3* гена *APOE* отмечалось снижение уровней ХС и ТГ, достигавшее статистической значимости для носителей *E4/E4* генотипа, по сравнению с повышением или отсутствием значимой динамики данных показателей у пациентов с другими вариантами генотипа: ХС: -46,25% для *E4/E4* против + 33,33% для *E4/E2*, + 5,73% для *E3/E2*, + 11,80% для *E3/E4*, -10,92% для *E3/E3*, соответственно,  $p=0,01$ ; ТГ: -56,52 % для *E4/E4* против + 24,43 % для *E4/E2*, + 19,63 % для *E3/E2*, + 8,05% для *E3/E4*, -20,00% для *E3/E3*, соответственно,  $p=0,04$ ) (рисунок 10)



**Рисунок 10. Динамика уровня ХС (а) и ТГ (б) на терапии статинами в зависимости от полиморфизма *E2/E3/E4* гена *APOE***

Таким образом, установлено, что выраженность гиполипидемического ответа на терапию статинами у больных СД2 ассоциирована с полиморфизмом двух генов: *Pro12Ala* гена *PPARG2* и *E2/E3/E4* гена *APOE*.

Генотипы *ProPro* гена *PPARG2* и *E4E4* гена *APOE* выступают в качестве факторов эффективного снижения ХС, ЛПНП и ТГ у больных СД2 и дислипидемией; напротив, генотипы *AlaPro* и *AlaAla* гена *PPARG2* и *E3E4*, *E3E2* и *E4E2* гена *APOE* выступают как факторы невосприимчивости к терапии статинами.

Статистически значимых различий выраженности гиполипидемического эффекта в зависимости от генотипа других генов: *TNF-α*, *LIPC*, *SLCO1B1*, *ACE*, в нашем исследовании не получено.

### 3.2.3. Анализ показателей функции эндотелия

Анализ графика окклюзионной пробы с расчетом % прироста постокклюзионной амплитуды сигнала (ПАС) после окклюзии позволяет косвенно оценить ФЭ сосудов. В норме наблюдается увеличение ПАС после окклюзии на 25%. Прирост ПАС менее 25% и/или снижение ПАС от исходного расценивается как нарушение ФЭ [127].

Исходно показатели функции эндотелия: показатели ригидности (SI, м/с), эластичности сосудов (RI, %) и ПАС были нарушены, через 12 месяцев терапии статинами у отдельных пациентов отмечалось повышение уровня данных показателей, у части - снижение, тем не менее, в целом, по группе, не достигавшее статистической значимости. Динамика показателей функции эндотелия до и через 12 месяцев терапии статинами представлена в таблице 16.

Таблица 16

**Динамика показателей эндотелиальной функции до и через 12 месяцев терапии, n=97**

Клинические параметры	Исходно	Через 12 мес терапии	p
ПАС	1,480 [1,149; 1,626]	1,543 [1,149; 1,608]	н/д <sup>1</sup>
SI, м/с	10,43[9,30; 11,96]	10,10 [9,2; 11,27]	н/д
RI, %	68 [61; 72]	67 [62; 70]	н/д

<sup>1</sup> – н/д – недостоверно; данные представлены: Ме [25 перцентиль; 75 перцентиль], %

Исходно пациенты с различными вариантами генотипа исследуемых генов были сопоставимы по показателям функции эндотелия и основным клиническим параметрам: полу, возрасту, ИМТ, длительности СД2, уровню HbA1c.

При этом динамика показателей ЭФ до и через 12 месяцев терапии статинами имела значимые различия в зависимости от генотипа 2-х изученных нами маркеров гена *TNF-α*: *G(308)A* и *G(238)A*.

Распределение аллелей и генотипов других генов (*PPARG2*, *APOE*, *LIPC*, *SLCO1B1*, *ACE*), по данным нашего исследования, не оказывало значимого влияния на динамику показателей функции эндотелия на терапии статинами у больных СД2.

### **3.2.3.1. Динамика прироста постокклюзионной амплитуды сигнала на терапии статинами в зависимости от полиморфизма *G(308)A* гена *TNFα***

За период терапии (12 месяцев) выявлены достоверные различия в динамике уровня ПАС в зависимости от полиморфизма *G(308)A* гена *TNFα* (таблица 17).



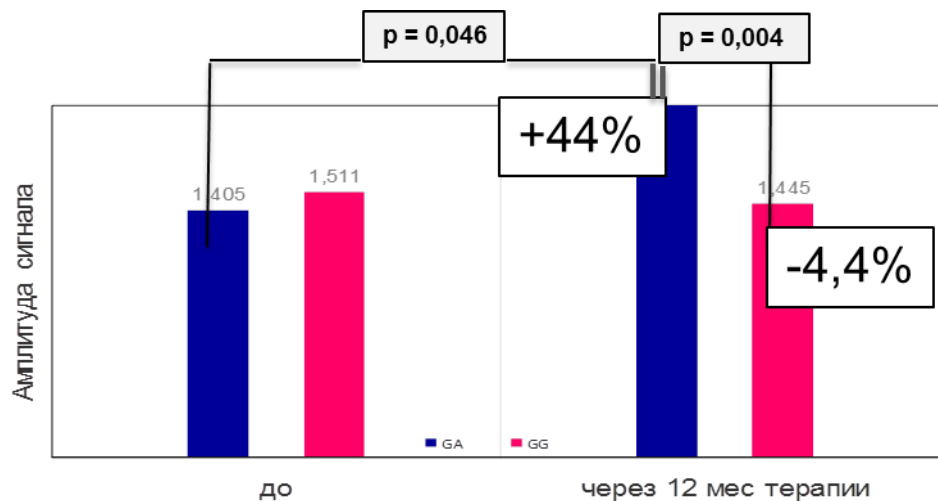
Таблица 17

**Динамика уровня ПАС в зависимости от генотипа  $G(308)A$  гена  $TNF\alpha$** 

Генотипы маркера $G(308)A$ гена $TNF\alpha$	$\Delta$ ПАС, %	p
$GG$	-4.4	0,004
$GA$	+44	

Через 12 месяцев терапии выявлены статистически значимые различия в показателях ФЭ в зависимости от полиморфизма  $G(308)A$  гена  $TNF-\alpha$ :

прирост ПАС у носителей генотипа  $GG$  маркера  $G(308)A$  по сравнению со снижением ПАС у носителей генотипа  $GA$ : +8,16 % против -0,93%, соответственно,  $p=0,04$  (рисунок 11);



**Рисунок 11. Улучшение функции эндотелия на терапии статинами в зависимости от полиморфизма  $G(308)A$  гена  $TNF\alpha$**

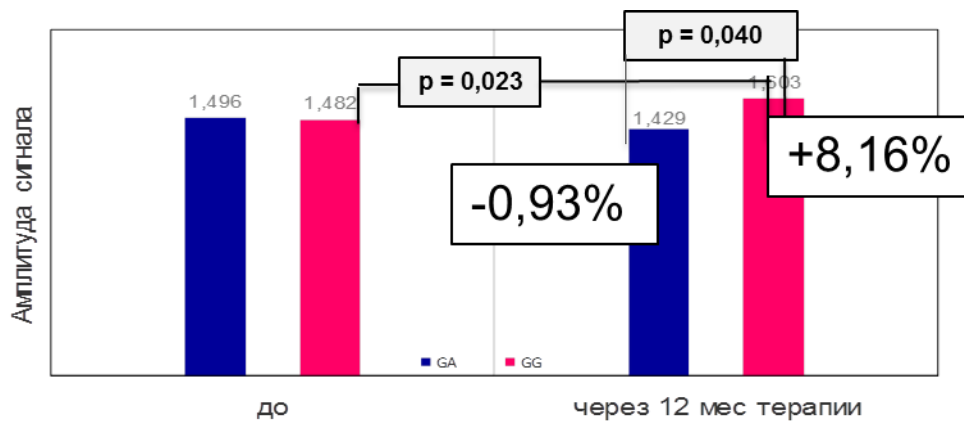
### 3.2.3.2. Динамика прироста постокклюзионной амплитуды сигнала на терапии статинами в зависимости от полиморфизма $G(238)A$ гена $TNF\alpha$

За период терапии (12 мес) выявлены достоверные различия в динамике уровня ПАС в зависимости от полиморфизма  $G(238)A$  гена  $TNF\alpha$  (таблица 18).

**Таблица 18**

**Динамика уровня ПАС в зависимости от генотипа  $G(308)A$  гена  $TNF\alpha$**

Генотипы маркера $G(238)A$ гена $TNF\alpha$	$\Delta$ ПАС, %	p
$GG$	+8,16	0,029
$GA$	-0,93	



**Рисунок 12. Улучшение функции эндотелия на терапии статинами в зависимости от полиморфизма  $G(238)A$  гена  $TNF\alpha$**

Таким образом, установлено, что динамика показателей эндотелиальной функции на фоне терапии статинами у больных СД2 ассоциирована с полиморфизмом гена  $TNF-\alpha$ . Генотипы  $GA$  полиморфного маркера  $G(-308)A$  и

*GG* полиморфного маркера *G(-238)A* гена *TNF-α* проявляли себя как факторы статистически значимого улучшения функции эндотелия на терапии статинами.

Напротив, генотипы *GG* полиморфного маркера *G(-308)A* и *GA* полиморфного маркера *G(-238)A* гена *TNF-α* проявляли себя как факторы снижения эндотелиальной функции, что подтверждает ключевую роль воспаления в реализации сердечно-сосудистых рисков при СД2

### **3.2.4. Распределение генотипов в группах с максимальным и минимальным гиполипидемическим эффектом на терапии статинами**

На основании полученных данных динамики липидного спектра, мы выделили две клинически «полярные» группы: группу клинических «респондеров» с максимальным ответом на терапию статинами, к которой были отнесены пациенты со снижением ХС и/или ЛПНП > 40% от исходного уровня (n=16), и группу резистентных пациентов, без значимого гиполипидемического эффекта (не было снижения липидов или отмечалось снижение менее 10% от исходного уровня (n=20)).

На основании данных анализа генов, показавших ассоциацию с выраженностью гиполипидемического эффекта, были выделены генотипы-«респондеры», т.е. генотипы, у носителей которых происходило значимое снижение уровней липидов. Остальные генотипы данных маркеров мы определили как генотипы-«не-респондеры».

#### **Генотипы-«респондеры»:**

1. *Pro/Pro* гена *PPARG2*
2. *E4/E4* и *E3/E3* гена *APOE*

#### **Генотипы «не-респондеры»:**

1. *Ala/Ala* и *Ala/Pro* гена *PPARG2*

## 2. *E3/E4, E4/E2 и E3/E2* гена *APOE*

Распределение генотипов в группах с максимальным и минимальным гиполипидемическим эффектом на терапии статинами представлено в таблице 19.

**Таблица 19**

**Распределение генотипов-«респондеров» и генотипов-«не-респондеров» в группах с максимальным и минимальным гиполипидемическим эффектом на терапии статинами**

Генотипы исследованных полиморфных маркеров	Распределение генотипов в группе с максимальным гиполипидемическим эффектом(%)	Распределение генотипов в группе с минимальным гиполипидемическим эффектом(%)	p
<i>Pro12Ala</i> гена <i>PPARG2</i>			
<i>ProPro</i>	100	50	<0,05
<i>ProAla</i>	0	25	
<i>AlaAla</i>	0	25	
<i>E2/E3/E4</i> гена <i>APOE</i>			
<i>E4E4</i>	33,3	0	<0,05
<i>E3E3</i>	66,6	25	
<i>E3E4</i>	0	25	
<i>E2E4</i>	0	25	
<i>E2E3</i>	0	25	

При анализе распределения генотипов в группе с максимальным и минимальным гиполипидемическим эффектом были выявлены статистически значимые различия соотношения генотипов-«респондеров» и «не-респондеров».

Так, все 100% пациентов с максимальным эффектом статинов были носителями двух генотипов-«респондеров», в то время как в группе пациентов, не ответивших на терапию статинами, 25% были носителями генотипов «не-респондеров» и 75% были носителями только одного генотипа-«респондера», из них 25% имели «более слабый» генотип *E3E3* гена *APOE*, при котором снижение уровня липидов хотя и отмечалось, но не достигало статистической значимости; пациентов, имевших 2 генотипа-«респондера» в этой группе не было (рисунок 13).



**Рисунок 13. Распределение генотипов в группах с максимальным (а) и минимальным (б) гипOLIпидемическим эффектом.**

### **3.2.5. Распределение генотипов, ассоциированных с эндотелиальной функцией в группах с максимальным и минимальным гипOLIпидемическим эффектом статинов**

На основании данных анализа генов, показавших ассоциацию с динамикой ЭФ на терапии статинами, также были выделены генотипы-«респондеры», т.е. генотипы, у носителей которых происходило значимое улучшение ЭФ.

Остальные генотипы данных маркеров мы определили как генотипы-«не-респондеры».

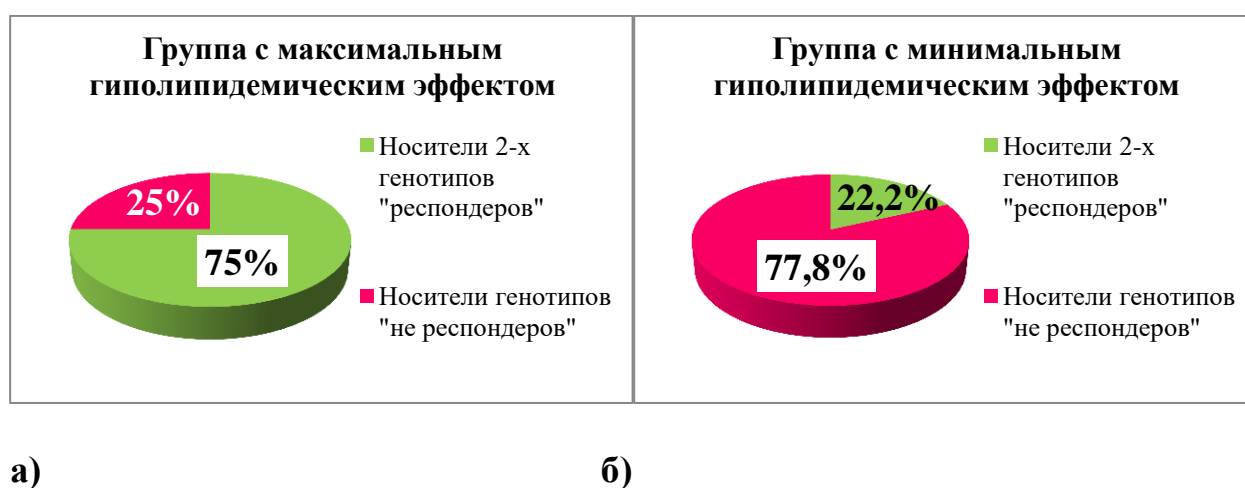
**Генотипы-«респондеры»:**

1. GA пм G(-308)A гена *TNF-α*
2. GG пм G(-238)A гена *TNF-α*

**Генотипы-«нереспондеры»:**

1. GG пм G(-308)A гена *TNF-α*
2. GA пм G(-238)A гена *TNF-α*.

При анализе распределения генотипов гена *TNF-α* в группе пациентов с улучшением эндотелиальной функции 75% пациентов были носителями 2-х генотипов-«респондеров» и 25% были носителями генотипов-«не-респондеров», в то время как в группе пациентов с отсутствием положительной динамики функции эндотелия, напротив, 22.2% были носителями генотипов-«респондеров» и большинство пациентов -77.8% - были носителями генотипов-«не-респондеров» (рисунок 14). Различия в соотношении генотипов-«респондеров» и «не-респондеров» в полярных группах были статистически значимы.



**Рисунок 14. Распределение генотипов в группах с максимальным (а) и минимальным (б) гипOLIпидемическим эффектом**

В группе с максимальным снижением липидов отмечалось накопление генотипов-респондеров, ассоциированных с большим гиполипидемическим эффектом (*E4E4*, *E3E3*, *ProPro*) и генотипов, ассоциированных с улучшением функции эндотелия (*GA* пм *G(-308)A* гена *TNF-α* и *GG* пм *G(-238)A* гена *TNF-α*), т.е., клинических и патогенетических «респондеров» на терапию статинами.

В группе резистентных пациентов, не ответивших на терапию статинами снижением липидов и улучшением эндотелиальной функции, отмечалось накопление генотипов-«не-респондеров»: *E2E4*, *E3E4*, *E2E3*, *ProAla*, *AlaAla* и *GG* пм *G(-308)A* гена *TNF-α* и *GA* пм *G(-238)A* гена *TNF-α*.

Таким образом, результат терапии статинами, как клинический - гиполипидемический эффект, так и патогенетический – улучшение эндотелиальной функции, имеет генетические детерминанты, и может прогнозироваться на основании индивидуального генетического типирования пациентов.

Полученные данные позволят в перспективе использовать генетическое исследование маркеров фармакогенетической эффективности статинов не только с целью персонализации терапии статинами, но и для индивидуальной оценки улучшения сердечно-сосудистого прогноза на данной терапии у больных СД2.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты работ по изучению фармакогенетики лекарственных средств неоднозначны. В литературе обсуждаются данные о фармакогенетических особенностях эффективности терапии антикоагулянтами и антидепрессантами [44-45]. В отношении статинов работы преимущественно посвящены изучению генетических маркеров развития побочных эффектов (миалгии и рабдомиолиза) [129].

По данным ряда исследований, подтверждена значимая роль дислипидемии в качестве одного из главных предикторов прогрессирования ССЗ [128]. Патогенетические пути поражения основаны на принципах формирования атеросклероза. В ряде работ показана ассоциация маркера *E2/E3/E4* гена *APOE* с ССЗ. Так, в ряде работ рассматривается ассоциация гена *APOE* с нарушениями мозгового кровообращения [130]. В одной работе выявлено, что носительство *e2* либо *e4* аллеля увеличивает риск развития ССЗ [131]. В настоящее время аллель *e4* в целом позиционируется в качестве маркера дислипидемии и фактора риска развития ССЗ. Так, показано, что регионы с высокой частотой встречаемости изоформы *e4* характеризуются и большей распространенностью ИБС. По данным ряда исследований, в популяциях с высокой частотой встречаемости аллеля *e4* полиморфного маркера *E2/E3/E4* гена *APOE* отмечается большая распространенность ИБС [132].

Анализ данных зарубежных исследований указывает также на связь полиморфного маркера *e2/e3/e4* гена *APOE* с развитием ДН как при СД 1, так и СД 2, что может указывать на то, что нарушения липидного метаболизма могут играть значительную роль в патогенезе ДН. В проведенном ранее исследовании была выявлена ассоциация полиморфного маркера *e2/e3/e4* гена *APOE* с развитием ДН при СД 1, что носительство аллеля *e3* и генотипа *e3/e3* маркера *e2/e3/e4* гена аполипопротеина Е (*APOE*) является фактором повышенного риска ДН при СД 1 [16].



У японских авторов описана ассоциация данного маркера с прогрессированием поражения почек при СД 2 от МАУ к протеинурии, где аллель *e2* рассматривается как независимый фактор риска прогрессирования ДН [133].

В нашей работе достоверной ассоциации маркера *e2/e3/e4* гена *APOE* с развитием ССЗ и/или ХБП выявлено не было. Возможно, требуется исследование на большей выборке больных. Тем не менее, в проведенном нами исследовании получена ассоциация выраженности гиполипидемического эффекта статинов в зависимости от полиморфизма *E2/E3/E4* гена *APOE*. Носители аллеля *e4* (аллеля риска ССЗ) более чувствительны к терапии статинами. Таким образом, носительство аллеля риска может влиять не только на более выраженное развитие данной патологии, но и определять более высокую чувствительность к патогенетической терапии.

По данным нашей работы, выявлена ассоциация полиморфизмов *G(238)A* и *G(308)A* гена *TNF-α* с улучшением ФЭ на терапии статинами у больных СД2. Ассоциации с гиполипидемическим эффектом статинов и риском развития ССЗ и ХБП выявлено не было. Вероятно, данный полиморфизм имеет этнические и гендерные особенности.

Гипергликемия и воспаление являются ключевыми в патогенезе сосудистых осложнений и поражения почек при СД. Кроме того, нарушение секреции ГПП-1 в настоящее время рассматривается не только как фактор развития СД, но и наиболее перспективный предиктор и терапевтический субстрат поражения почек при СД [134, 135].

Поэтому немаловажную роль в развитии сосудистых осложнений СД2 и влиянии на фармакогенетику статинов, теоретически, должны оказывать гены, вовлечённые в систему синтеза и секреции инсулина. Одним из наиболее перспективных генов данной группы представляется *PPARγ* [24].

Ген *PPARγ* кодирует ядерный рецептор  $\gamma$ , активация которого индуцирует экспрессию многих генов липогенеза и ингибирование липолиза, что в свою

очередь повышает чувствительность тканей к инсулину. Полиморфизм гена *PPARG2Pro12Ala*, ведущий к снижению синтеза белка данного рецептора, показал достоверную ассоциацию с развитием ожирения и СД 2. Установлено, что мутации в гене *PPARG* являются причиной *PPAR $\gamma$*  лиганд-резистентного синдрома, который проявляется комплексом инсулинорезистентности, дислипидемии, гипертензии, увеличения массы тела и нарушения гомеостаза глюкозы. Пациенты с генотипом *AlaAla* предрасположены к большему набору веса [136].

Обсуждение связи данного гена с развитием ХБП в литературе звучит уже с 2008 года. Диабет является один из самых главных факторов риска развития ХБП [3]. Патофизиологические пути данной генетической связи ещё активно обсуждаются в научном мире, влияние данного гена на снижение СКФ через гипергликемию или же существует другой путь воздействия. Тем не менее, в нашей работе достоверной ассоциации маркера *Pro12Ala* гена *PPARG2* с развитием ССЗ и/или ХБП выявлено не было. Возможно, требуется исследование на большей выборке больных, не исключено что указанный полиморфизм имеет этнические и гендерные различия.

По данным нашего исследования, у носителей генотипа *Pro/Pro* отмечалось большее и статистически значимое снижение уровней ХС и ЛПНП на терапии статинами по сравнению с отсутствием значимой динамики у пациентов с генотипами *Pro/Ala* и *Ala/Ala*. Аналогичные данные о большей гиполипидемической эффективности статинов при генотипе *ProPro* гена *PPARG2* показаны в работе 2014 года González et al [24].

Наиболее известным геном, ответственным за продукцию вазоактивных факторов эндотелия, является *ACE* (полиморфизм - вставка/отсутствие вставки (*I/D*, insertion/deletion)). Связь этого полиморфного маркера с развитием атеро- и гломерулосклероза имеет четкие патогенетические механизмы, т.к. повышение уровня *ACE* приводит к гиперпродукции ангиотензина II — мощного вазоактивного и рост-стимулирующего фактора, являющегося медиатором

прогрессирования ССЗ при СД2 [53]. Генотип *DD* гена *ACE*, который отличается более высоким уровнем АПФ, должен определять более высокую частоту развития ССЗ и ДН и, напротив, генотип *Ii*, с более низким уровнем фермента, должен быть протективным в отношении развития сердечно-сосудистой и почечной патологии [137].

Имеются сведения об ассоциации полиморфизма гена *ACE* с ССЗ: АГ, ИМ, гипертрофией левого желудочка [76, 137, 138]. Выявлено, что генотип *DD* предрасполагает к развитию ИБС. Также имеются данные о наличии ассоциации *I/D* полиморфизма *ACE* с сосудистыми осложнениями СД [139].

Результаты некоторых мета-анализов подтверждают роль маркера *I/D* гена *ACE* в развитии ДН [140-141]. Показано, что носительство аллеля *D* предрасполагает к развитию ДН. Аналогичные данные получены в крупнейшем исследовании по генетике нефропатии — EDIC Genetics Study, проведенного в рамках DCCT, который включил данные 47 исследований за 10 лет и 14727 пациентов с СД: выявлено, что *I/D* полиморфизм гена *ACE* влияет на развитие ДН в обоих типах СД, риск развития нефропатии у носителей генотипа *DD* (OR = 1,28) [142]. Сходные данные получены на большой когорте работ, подтвердив информацию о том, что полиморфизм *I/D* гена *ACE* ассоциирован с развитием ДН, особенно у азиат с СД 2 [143, 144, 145]. В этих работах сделан акцент на этническую предрасположенность данного маркера при СД 2 типа.

Также была обнаружена ассоциация полиморфного маркера *I/D* гена *ACE* с быстрым прогрессированием почечной патологии. Так, у пациентов с терминальной ХПН различного генеза носительство генотипа *DD* было ассоциировано со скорым по времени прогрессированием ХПН [145].

В ряде исследований показана ассоциация маркера *I/D* гена *ACE* с развитием ДН при СД1, но не при СД2. По данным нашей предыдущей работы, не выявлено ассоциации этого маркера с риском ХБП при СД2 [7]. В настоящем исследовании не было выявлено ассоциации маркера *I/D* гена *ACE* ни с развитием ХБП, ни с развитием ССЗ, ни с сочетанным развитием ХБП и ССЗ у

пациентов с СД2. Также не было выявлено различий в фармакологической эффективности статинов в зависимости от полиморфизма *I/D* гена *ACE*. Разница результатов исследований, проведенных на одной этнической группе, но на разных типах СД, говорит о разобщении генетических детерминант поражения почек при разных типах СД.

Также имеются сведения об ассоциации полиморфного маркера *I/D* гена *ACE* с нарушением ФЭ: у носителей генотипа *DD* выявлены достоверно большие толщина интима-медиа и распространенность атеросклероза по сравнению с пациентами с генотипами *II* и *ID* [146]. Однако зависимости динамики показателей ФЭ от распределения генотипов маркера *I/D* гена *ACE* на терапии статинами у пациентов с СД 2 в нашем исследовании выявлено не было.

По данным ряда работ, влияние полиморфизма *I/D* гена *ACE* на развитие ССЗ и ХБП зависит от пола и этнической принадлежности. Так у мужчин азиатского происхождения значения ассоциации (OR) с ХБП были выше, чем у женщин, чего не наблюдалось среди лиц европеоидной расы. В одной работе при СД2 исследователи показали влияние аллеля *D* на развитие ДН среди пациентов с длительностью диабета менее 10 лет, а в группе с длительностью более 10 лет данный аллель риск развития ДН не увеличивает [147]. Наши группы были сформированы с преобладанием женщин.

Имеются немногочисленные данные о вкладе полиморфизма гена *ACE* в фармакологическую эффективность терапии статинами. Так, в исследовании на ливанской популяции была выявлена ассоциация аллеля *D* гена *ACE* с гиперхолестеринемией. В 5-летнем исследовании Cholesterol and Recurrent Events (CARE) у пациентов с ИМ и дислипидемией на фоне терапии правастатином проанализирован эффект сочетанного влияния двух типов полиморфизмов (*I/D* полиморфизма гена *ACE* и *PIA1/A2* гена гликопротеина *IIIa*. Максимальный эффект правастатина выявлен у пациентов с *D* аллелем гена *АПФ* и *PIA1/A2* гена гликопротеина *IIIa* [52].

Резюмируя выше сказанное, можно сделать вывод, что ассоциация полиморфизма *I/D* гена *ACE* с развитием ССЗ и ДН при СД представляется вероятной. Отсутствие достоверной ассоциации данного маркера с ССЗ, ХБП, а также - гиполипидемической эффективностью статинов и показателями функции эндотелия может быть обусловлено тем, что данный полиморфизм имеет этнические и гендерные особенности. Также, вероятно, вклад данного маркера в развитие сосудистых осложнений при СД2 не столь значим вследствие большой многофакторности поражения при данном типе заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования подтверждено, что развитие сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и хронической болезни почек (ХБП) при СД2 генетически детерминировано. Выявлена достоверная ассоциация маркера *G(-308)A* гена *TNF-α* с риском сочетанного развития ССЗ и ХБП при СД2, что подтверждает ведущую роль фактора воспаления в генезе сосудистых осложнений и позволяет предложить использовать данный полиморфный маркер для прогнозирования сочетанного развития ХБП и ССЗ с целью формирования группы высокого риска сочетанного развития данных осложнений у больных СД2. Идентификация молекулярно-генетических маркеров сосудистых осложнений позволит подойти к возможности оценивать и прогнозировать сердечно-сосудистый риск на доклиническом этапе.

Выраженность гипополипидемического эффекта и динамика эндотелиальной функции на терапии статинами генетически детерминированы и ассоциированы с полиморфизмом генов (*Pro12Ala* гена *PPARG2*, *E2/E3/E4* гена *APOE*), *G(308)A* и *G(238)A* гена *TNF-α*), модулирующих ключевые факторы развития и прогрессирования сосудистых осложнений при СД – липидный обмен, инсулинорезистентность и процессы воспаления. Данная панель генетических маркеров в перспективе позволит прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ и учитывать индивидуальные риски конкретного больного, а также открывает возможности перехода от стандартной терапии к персонализированным подходам в лечении атеросклероза и сердечно-сосудистых осложнений.

## ВЫВОДЫ

1. Сердечно-сосудистые осложнения у пациентов с СД2 не показали достоверной ассоциации с полиморфизмом генов – кандидатов, кодирующих ключевые факторы развития атеросклероза при СД: *Pro12Ala* гена *PPARG2*, *G(-308)A* гена *TNF-α*, *G(-238)A* гена *TNF-α*, *E2/E3/E4* гена *APOE*, *I/D* гена *ACE*, *C-514T* гена *LIPC*, *SLCO1 B1\*5* гена *SLCO1 B1*, что может указывать на большее значение в развитии сердечно-сосудистых заболеваний негенетических факторов риска.

2. Установлено, что риск сочетанного развития сердечно-сосудистых заболеваний и хронической болезни почек у больных СД2 ассоциирован с полиморфизмом *G(-308)A* гена *TNF-α*, кодирующего фактор некроза опухоли (носительство аллеля *A* и генотипа *GA* – повышало риск развития, с  $OR=2.88$  и  $OR=1,77$ , носительство аллеля *G* и генотипа *GG* оказывало протективное влияние, с  $OR=0,35$  и  $OR=0,29$ , соответственно), что отражает значимое участие фактора воспаления в генезе нефрокардиального синдрома у больных СД2.

3. Установлено, что выраженность гиполипидемического ответа на терапию статинами у больных СД2 ассоциирована с полиморфизмом двух генов: *Pro12Ala* гена *PPARG2* и *E2/E3/E4* гена *APOE*. Генотипы *ProPro* гена *PPARG2* и *E4E4* гена *APOE* выступают в качестве факторов эффективного снижения ХС, ЛПНП и ТГ у больных СД2 и дислипидемией; напротив, генотипы *AlaPro* и *AlaAla* гена *PPARG2* и *E3E4*, *E3E2* и *E4E2* гена *APOE* выступают как факторы невосприимчивости к терапии статинами.

4. Установлено, что динамика показателей эндотелиальной функции на фоне терапии статинами у больных СД2 ассоциирована с полиморфизмом гена *TNF-α*. Генотипы *GA* пм *G(-308)A* и *GG* пм *G(-238)A* гена *TNF-α* проявляли себя как факторы статистически значимого улучшения функции эндотелия на терапии статинами. Напротив, генотипы *GG* пм *G(-308)A* и *GA* пм *G(-238)A* гена *TNF-α* проявляли себя как факторы снижения эндотелиальной функции, что

подтверждает ключевую роль воспаления в реализации сердечно-сосудистых рисков при СД2



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Генетическое обследование больных СД2 с оценкой полиморфизма *G(-308)A* гена *TNF-α* позволяет прогнозировать группу риска сочетанного развития сердечно-сосудистой патологии и хронической болезни почек, требующей более активного наблюдения и обследования для выявления патологии на ранних стадиях.

2. При лечении дислипидемии статинами у больных СД2 необходимо учитывать фактор генетической невосприимчивости (нечувствительности), что может обуславливать неэффективность терапии даже при хорошей комплаентности больного. Генетическое обследование больных СД2 с оценкой полиморфизма генов *APOE* и *PPARG2* можно использовать в качестве перспективного метода персонификации терапии статинами у больных СД 2.

3. Установлено, что гиполипидемический ответ на терапию статинами отражает патогенетические изменения эндотелиальной функции, что предполагает использование маркеров фармакогенетической эффективности статинов для индивидуальной оценки улучшения сердечно-сосудистого прогноза на данной терапии у больных СД2.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

*ACE* - ген фермента, превращающего ангиотензин I

*APOE* - ген, кодирующий аполипопротеин E

HbA1c – гликированный гемоглобин

*LIPC* - ген, кодирующий печеночную липазу

Me - медиана

OR - odds ratio (соотношение шансов)

p - вероятность

*PPARG2* - ген рецептора, активируемого пролифератором пероксисом гамма 2

rs – регуляторная область гена

*SLCO1B1* - ген полипептида, транспортирующего органические анионы

SNP - single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)

*TNF-α* - ген фактора некроза опухоли альфа

АП - ангиотензин II

АГ – артериальная гипертензия

АД - артериальное давление

АПФ – фермент, превращающий ангиотензин I

БРА - блокаторы рецептора к ангиотензину II

ДАД - диастолическое артериальное давление

ДИ – доверительный интервал

ДН – диабетическая нефропатия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

иАПФ - ингибиторы ангиотензин- превращающего фермента

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМ - инфаркт миокарда

ИМТ - индекс массы тела

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

ЛС - лекарственное средство

МАУ – микроальбуминурия

н/д – недостоверно

ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения

ПАС - постокклюзионный прирост амплитуды сигнала

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РААС - ренин-ангиотензин-альдостероновая система

РАС - ренин-ангиотензиновая система

САД - систолическое артериальное давление

СД - сахарный диабет

СД1 - сахарный диабет 1 типа

СД2 - сахарный диабет 2 типа

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТГ - триглицериды

ФЭ – функция эндотелия

ХБП – хроническая болезнь почек

ХС – холестерин общий

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сахарный диабет: диагностика, лечение и профилактика: в 2-х т. / И.И. Дедов, М.В. Шестакова и др. - М.: Медицинское информационное агентство, 2011. - Т 1. - 808 с.
2. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек / М.В. Шестакова, И.И. Дедов и др. - М.: Медицинское информационное агентство, 2009. — 482 с.
3. Маслова, О.В. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений / О.В. Маслова, Ю.И. Сунцов // Сахарный диабет.- 2011. - № 3. – С. 6–11.
4. Викулова, О.К. Показатели вазомоторной функции эндотелия и эластичности артериальной стенки при терапии ингибитором ангиотензин-превращающего фермента рамиприлом у больных сахарным диабетом 2-го типа / О.К. Викулова, И.Р. Ярек-Мартынова, Н.П. Трубицына, М.В. Шестакова // Кардиология. - 2008. – № 11. - С. 47—52.
5. Дедов, И.И. Государственный регистр сахарного диабета в российской федерации: статус 2014 г. и перспективы развития / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. - 2015. - № 3. - С. 5-22.
6. Железнякова, А.В. Риск развития сердечно-сосудистой патологии и хронической болезни почек у больных сахарным диабетом 2 типа детерминирован полиморфизмом генов NOS3, APOB, KCNJ11, TCF7L2 / А.В. Железнякова, Н.О. Лебедева, О.К. Викулова, В.В. Носиков, М.Ш. Шамхалова, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. - 2014. - № 3. - С.23-30.
7. Reiner, Ž. Resistance and intolerance to statins / Ž. Reiner // Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. - 2014. - Vol. 24. - № 10. - P. 1057-1066.
8. Викулова, О.К. Клинико-лабораторные и генетические факторы развития и прогрессирования диабетической нефропатии у больных сахарным

диабетом 1 типа: дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.03 / Викулова Ольга Константиновна. – М., 2003.- 123 с.

9. Шестакова, М.В. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек: достижения, нерешенные проблемы и перспективы лечения / М.В. Шестакова, М.Ш. Шамхалова, И.Я. Ярэк-Мартынова, И.И. Клефтортова, О.Ю. Сухарева, О.К. Викулова, Н.В. Зайцева, С.А. Мартынов, М.В. Кварацхелия, Е.В. Тарасов, Н.П. Трубицына // Сахарный диабет. – 2011. - № 1. – С. 81-88.
10. Маслова, О.В. Распространенность поражения почек при сахарном диабете 1 и 2 типов в Российской Федерации / О.В. Маслова, Ю.И. Сунцов, М.В. Шестакова, И.В. Казаков, О.К. Викулова, О.Ю. Сухарева, С.А. Мартынов, Н.П. Трубицына // Сахарный диабет. – 2009. - № 4. - С. 47-51.
11. Valanti, E. Pharmacogenomics in the development and characterization of atheroprotective drugs / E. Valanti, A. Tsompanidis, D. Sanoudou // Methods in Molecular Biology. - 2014. - Vol. 1175. - P. 259–300.
12. Remuzzi, G. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease / G. Remuzzi, N. Perico, M. Macia, P. Ruggenenti // Kidney International. – 2005. - Vol. 68. - P. 57-65.
13. Журавлева, М.В. Эффективность и безопасность применения лекарственных средств: значение и возможности клинической фармакологии / М.В. Журавлева, В.Г. Кукес, А.Б. Прокофьев, В.В. Архипов, Ю.В. Олефир, С.Ю. Сереброва, А.В. Соколов, Д.А. Сычев // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. - № 2. – С. 20–24.
14. Дедов, И.И. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы / И.И. Дедов, А.Н. Тюльпаков, В.П. Чехонин, В.П. Баклаушев, А.И. Арчаков, С.А. Мошковский // Вестник РАМН. – 2012. - № 12. - С. 4-12.

15. Доборджинидзе, Л.М. Роль статинов в коррекции диабетической дислипидемии / Л.М. Доборджинидзе, Н.А. Грацианский // Сахарный диабет. - 2001. - № 2. - С. 41-47.
16. Shestakova, M. The relationship between genetic and haemodynamic factors in diabetic nephropathy (DN): Case-control study in type 1 diabetes mellitus (T1DM) / M. Shestakova [et al.] // Diabetes Research and Clinical Practice. – 2006. - Vol. 74. - № 2. - P. 41-50.
17. Викулова, О.К. Показатели вазомоторной функции эндотелия и эластичности артериальной стенки при терапии ингибитором ангиотензина-превращающего фермента рамиприлом у больных сахарным диабетом 2-го типа / О.К. Викулова [и др.] // Кардиология. —2008. – №11. - С. 47-52.
18. Rodrigues, A. Genetic variants in genes related to lipid metabolism and atherosclerosis, dyslipidemia and atorvastatin response / A. Rodrigues [et al.] // Clinica Chimica Acta. – 2013. – Vol. 417. – P. 8-11.
19. Villeneuve, S. The potential applications of Apolipoprotein E in personalized medicine / S. Villeneuve, D. Brisson, N. Marchant, D Gaudet // Frontiers in Aging Neuroscience. – 2014. - Vol. 154. – P. 3-6.
20. Koopal, C. Influence of APOE-2 genotype on the relation between adiposity and plasma lipid levels in patients with vascular disease / C. Koopal, Y. van der Graaf, F. Asselbergs, J. Westerink, F. Visseren // Int J Obes Relat Metab Disord. – 2015. - Vol. 39. - № 2. - P. 265–269.
21. AlBacha, J. High Incidence of ACE/PAI-1 in Association to a Spectrum of Other Polymorphic Cardiovascular Genes Involving PBMCs Proinflammatory Cytokines in Hypertensive Hypercholesterolemic Patients: Reversibility with a Combination of ACE Inhibitor and Statin / J. AlBacha [et al.] // PLOS ONE. – 2015. - Vol. 10 - № 5. – P. e0127266.

22. Güney, A. Effects of ACE polymorphisms and other risk factors on the severity of coronary artery disease / A. Güney [et al.] // *Genetics and Molecular Research*. – 2013. - Vol. 12. - № 4. - P. 6895–6906.
23. Baskova, I. Analysis of the effects of medicinal leech on arterial function in elderly volunteers by means of photoplethysmography with Angioscan-01 / I. Baskova, I. Pavlova, A. Parfenov // *Human Physiology*. – 2014. - Vol. 40. - № 2. - P. 214-219.
24. Miramontes González, J. PPAR gamma pro12Ala polymorphism and type 2 diabetes: a study in a spanish cohort / J. Miramontes González [et al.] // *J Genet Stud*. – 2014. - Vol. 2. - № 1. – P. 1.
25. Сычев, Д.А. Персонализированная антикоагулянтная терапия на основе результатов фармакогенетического тестирования: методическое пособие / Д.А. Сычев. - С-Пб.: Алкор Био, 2010. – 42 с.
26. Каралкин, П.А. Опыт внедрения фармакогенетического тестирования по CYP2C19 для персонализации применения антиагрегантов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями в многопрофильном стационаре / П.А. Каралкин [и др.] // *Фармакогенетика и Фармакогеномика*. – 2015. - № 1. – С. 24-29.
27. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) // *Lancet*. – 1994. - Vol. 344. - № 8934. - P. 1383-1389.
28. Sacks, F.M. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels / F.M. Sacks [et al.] // *N Engl J Med*. – 1996. – Vol. 335. - № 14. - P. 1001-1009.
29. Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels // *N Engl J Med*. – 1998. - Vol. 339. - № 19. - P. 1349-1357.

30. Shepherd, J. Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia / J. Shepherd [et al.] // N Engl J Med. – 1995. - Vol. 333. - № 20. - P. 1301-1308.
31. Downs, JR. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS / JR Downset [et al.] for the AFCAPS/TexCAPS Research Group // JAMA. – 1998. - Vol. 279. - P. 1615-1622.
32. Olsson, A. LDL cholesterol goals and cardiovascular risk during statin treatment: the IDEAL study / A. Olsson [et al.] // European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. - 2011. - Vol. 18. - № 2. - P. 262-269.
33. Kleinberger, J.W. Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects / J.W. Kleinberger, T.I. Pollin // Ann N Y Acad Sci. – 2015. - Vol. 1346. - № 1. - P. 45-56.
34. Semiz, S. Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes / S. Semiz, T. Dujic, A. Causevic // Biochem Med. – 2013. - Vol 23. - № 2. - P. 154-171.
35. Valdes, R.Jr. Fundamentals of Pharmacogenetics in Personalized, Precision Medicine / R.Jr. Valdes, D.T. Yin // Clin Lab Med. – 2016. - Vol 36. - № 3. - P. 447-459.
36. Knaggs, R. Personalised medicine and medicines optimisation / R. Knaggs // British Journal of Pain. - 2016. - Vol. 10. - № 4. - P. 167-167.
37. Лебедева, Н.О. Маркеры доклинической диагностики диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа / Н.О. Лебедева, О.К. Викулова // Сахарный диабет. - 2012. - № 2. - С. 38-45.
38. Щукина, А.А. Экскреция с мочой маркеров повреждения подоцитов у больных сахарным диабетом / А.А. Щукина [и др.] // Терапевтический архив. - 2015. - Т. 87. - № 10. - С. 62-66.



39. Anaya, J.M. Personalized medicine. Closing the gap between knowledge and clinical practice / J.M. Anaya [et al.] // *Autoimmun Rev.* – 2016. - Vol. 15. - № 8. - P. 833-842.
40. 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.
41. Дедов, И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений / И.И. Дедов // *Сахарный диабет.* – 2013. – № 3. – С. 2-10.
42. Ehmann, F. European Medicines Agency initiatives and perspectives on pharmacogenomics / F. Ehmann, L. Caneva, M. Papaluca // *Br. J. Clin. Pharmacol.* - 2014. - Vol. 77. - № 4. - P. 612–617.
43. Ni, X. Pharmacogenomics discovery and implementation in genome-wide association studies era / X. Ni, W. Zhang, R.S. Huang // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* - 2012. - Vol. 5. - № 1. - P. 1–9.
44. Cargnin, S. Diagnostic accuracy of *HLA-B\*57:01* screening for the prediction of abacavir hypersensitivity and clinical utility of the test: a meta-analytic review / S. Cargnin [et al.] // *Pharmacogenomics.* - 2014. - Vol. 15. - № 7. - P. 963–976.
45. Maier, CL. Pharmacogenetics in Oral Antithrombotic Therapy / C.L. Maier, A. Duncan, C.E. Hill // *Clin Lab Med.* - 2016. - Vol. 36. - № 3. – P. 461-472.
46. Pirmohamed, M. Personalized Pharmacogenomics: Predicting Efficacy and Adverse Drug Reactions / M. Pirmohamed // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* - 2014. - Vol. 15. - P. 1.
47. Gray, S.P. The pathobiology of diabetic vascular complications—cardiovascular and kidney disease / S.P. Gray, K. Jandeleit-Dahm // *J. Mol. Med.* - 2014. - Vol. 92. - № 5. - P. 441–452.

48. Bahtiyar, G. Heart Failure: a Major Cardiovascular Complication of Diabetes Mellitus / G. Bahtiyar, D. Gutterman, H. Lebovitz // *Curr. Diab. Rep.* - 2016. - Vol. 16. - P. 116.
49. Schnell, O. Current perspectives on cardiovascular outcome trials in diabetes / O. Schnell [et al.] // *Cardiovasc. Diabetol. BioMed Central.* - 2016. - Vol. 15. - P. 139.
50. Chawla, A. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? / A. Chawla, R. Chawla, S. Jaggi // *Indian J. Endocrinol. Metab. Medknow Publications.* - 2016. - Vol. 20. - № 4. - P. 546–551.
51. Аметов, А.С. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания / А.С. Аметов, И.О. Курочкин, А.А. Зубков // *РМЖ.* - 2014. - №13. - С. 954.
52. Balkau, B. High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged nondiabetic men. 20-year follow-up in the Whitehall Study, the Paris Prospective Study, and the Helsinki Policemen Study / B. Balkau [et al.] // *Diabetes Care.* - 1998. - Vol. 21. - № 3. - P. 360–367.
53. Сахарный диабет: диагностика, лечение и профилактика: в 2-х т. / И.И. Дедов, М.В. Шестакова [и др.] - М.: Медицинское информационное агентство, 2011. - Т 2. - 808 с.
54. Relationship between baseline risk factors and coronary heart disease and total mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group // *Prev. Med. (Baltim).* - 1986. - Vol. 15. - № 3. - P. 254–273.
55. Herrington, W. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease / W. Herrington [et al.] // *Circ. Res.* - 2016. - Vol. 118. - № 4. - P. 535-546.
56. Kozakova, M. Diabetes Mellitus, Arterial Wall, and Cardiovascular Risk Assessment / M. Kozakova, C. Palombo // *Int. J. Environ. Res. Public Health. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).* - 2016. - Vol. 13. - № 2. - P. 201.

57. Patel, T.P. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes / T.P. Patel [et al.] // Heart Fail. Rev. - 2016. - Vol. 21. - № 1. - P. 11–23.
58. Chen, Y.Y. The Impact of Diabetes Mellitus and Corresponding HbA1c Levels on the Future Risks of Cardiovascular Disease and Mortality: A Representative Cohort Study in Taiwan / Y.Y. Chen [et al.] // PLoS One. - 2015. - Vol. 10. - № 4. - P. e0123116.
59. Ahlqvist, E. The genetics of diabetic complications / E. Ahlqvist [et al.] // Nat. Rev. Nephrol. - 2015. - Vol. 11. - № 5. - P. 277–287.
60. Лебедева, Н.О. Фармакогенетика терапии статинами и показатели функции эндотелия у больных сахарным диабетом 2 типа / Н.О. Лебедева, О.К. Викулова, А.Г. Никитин, М.Ш. Шамхалова, М.В. Шестакова, И.И. Дедов // Сахарный диабет. - 2016. - Т. 19. - № 3. - С. 204-211.
61. Tandon, N. Pharmacologic prevention of microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Implications of the results of recent clinical trials in type 2 diabetes / N. Tandon, M.K. Ali, K.M.V. Narayan // Am. J. Cardiovasc. Drugs. - 2012. - Vol. 12. - № 1. - P. 7–22.
62. Gore, M.O. Predicting Cardiovascular Risk in Type 2 Diabetes: the Heterogeneity Challenges / M.O. Gore [et al.] // Curr. Cardiol. Rep. - 2015. - Vol. 17. – № 7. – P. 54.
63. Kohen Avramoglu, R. The genetic and metabolic determinants of cardiovascular complications in type 2 diabetes: recent insights from animal models and clinical investigations / R. Kohen Avramoglu [et al.] // Can. J. diabetes. Elsevier Ltd. - 2013. - Vol. 37. - № 5. - P. 351–358.
64. Ronco, C. Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative / C. Ronco [et al.] // European Heart Journal. - 2009. - Vol. 31. - № 6. - P. 703-711.

65. Liu, Y. Beneficial effects of statins on endothelial progenitor cells / Y. Liu [et al.] // *Am. J. Med. Sci. Elsevier Masson SAS*. - 2012. - Vol. 344. - № 3. - P. 220–226.
66. Hermida, N. Low-density lipoprotein-cholesterol-induced endothelial dysfunction and oxidative stress: the role of statins / N. Hermida, J.-L. Balligand // *Antioxid. Redox Signal.* - 2014. - Vol. 20. - № 8. - P. 1216–1237.
67. Margaritis, M. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: beyond lipid lowering / M. Margaritis, K.M. Channon, C. Antonia // *Antioxid. Redox Signal.* - 2014. - Vol. 20. - № 8. - P. 1198–1215.
68. Arrebola-Moreno, A.L. Noninvasive assessment of endothelial function in clinical practice / A.L. Arrebola-Moreno, M. Laclaustra, J.C. Kaski // *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.)*. - 2012. - Vol. 65. - № 1. - P. 80–90.
69. Fujisue, K. Effects of endothelial dysfunction on residual platelet aggregability after dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in patients with stable coronary artery disease / K. Fujisue [et al.] // *Circ. Cardiovasc. Interv.* - 2013. - Vol. 6. - № 4. - P. 452–459.
70. Gokce, N. Clinical assessment of endothelial function ready for prime time? / N. Gokce // *Circ. Cardiovasc. Imaging.* - 2011. - Vol. 4. - № 4. - P. 348–350.
71. Rajendran, P. The vascular endothelium and human diseases / P. Rajendran // *Int. J. Biol. Sci.* - 2013. - Vol. 9. - № 10. - P. 1057–1069.
72. Rubinshtein, R. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events / R. Rubinshtein [et al.] // *Eur. Heart J.* - 2010. - Vol. 31. - № 9. - P. - 1142–1148.
73. Science, M. Assessment Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension Duration of 2 Years by Ultrasonography / M. Science // *Indian Journal Of Applied Research.* - 2015. - Vol. 5. - № 11. - P. 493–494.
74. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications / M. Brownlee // *Nature.* - 2001. - Vol. 414. - № 6865. - P. 813–820.

75. Grossman, Y. Treating hypertension in type 2 diabetes / Y. Grossman, G. Shlomai, E. Grossman // *Expert Opin. Pharmacother.* - 2014. - Vol. 15. - № 15. - P. 2131–2140.
76. Макаревич, П.И. Комбинации аллелей генов NOS3 и CYBA и риск развития эссенциальной артериальной гипертензии у мужчин / П.И. Макаревич [и др.] / *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* - 2010. - Т. 9. - № 3. - С. 4–9.
77. Hurtubise, J. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis / J. Hurtubise [et al.] // *Current Atherosclerosis Reports.* - 2016. - Т. 18. - № 12. – P. 82.
78. Bays, H.E. National lipid association annual summary of clinical lipidology 2015 / H.E. Bays [et al.] // *J. Clin. Lipidol.* Elsevier Inc. - 2014. - Vol. 8. - № 6. - P. S1–S36.
79. Nicholls, S.J. Lipid pharmacotherapy for treatment of atherosclerosis / S.J. Nicholls // *Expert Opin. Pharmacother.* - 2014. - Vol. 15. - № 8. - P. 1119–1125.
80. Sobenin, I. Low Density Lipoprotein-Containing Circulating Immune Complexes: Role in Atherosclerosis and Diagnostic Value / I. Sobenin [et al.] // *BioMed Research International.* - 2014. - Vol. 2014. - P. 1-7.
81. Rahimi, Z. The Role of Renin Angiotensin Aldosterone System Genes in Diabetic Nephropathy / Z. Rahimi // *Canadian Journal of Diabetes.* - 2016. - Vol. 40. - № 2. - P. 178-183.
82. Patel, V. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in diabetic cardiovascular complications / V. Patel, N. Parajuli, G. Oudit // *Clinical Science.* - 2014. - Vol. 126. - № 7. - P. 471-482.
83. Pacurari, M. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling / M. Pacurari [et al.] // *International Journal of Inflammation.* - 2014. - Vol. 2014. - P. 1-13.

84. Becher, U. Endothelial Damage and Regeneration: The Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System / U. Becher [et al.] // Current Hypertension Reports. - 2010. - Vol. 13. - № 1. - P. 86-92.
85. Mascolo, A. New and old roles of the peripheral and brain renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases / A. Mascolo [et al.] // International Journal of Cardiology. - 2016. – P. 1-40.
86. Conti, P. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells / P. Conti, Y. Shaik-Dasthagirisab // Central European Journal of Immunology. - 2015. - Vol. 3. - P. 380-386.
87. Kitazume, S. Sweet role of platelet endothelial cell adhesion molecule in understanding angiogenesis / S. Kitazume [et al.] // Glycobiology. - 2014. - Vol. 24. - № 12. - P. 1260-1264.
88. Jaipersad, A. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis / A. Jaipersad // Journal of the American College of Cardiology. - 2014. - Vol. 63. - № 1. - P. 1-11.
89. Wrigley, B. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure / B. Wrigley, G. Lip, E. Shantsila // European Journal of Heart Failure. - 2011. - Vol. 13. - № 11. - P. 1161-1171.
90. Ismahil, M. Remodeling of the Mononuclear Phagocyte Network Underlies Chronic Inflammation and Disease Progression in Heart Failure: Critical Importance of the Cardiosplenic Axis / M. Ismahil [et al.] // Circulation Research. - 2013. - Vol. 114. - № 2. - P. 266-282.
91. Bitzur, R. Intolerance to Statins: Mechanisms and Management / R. Bitzur [et al.] // Diabetes Care. - 2013. - Vol. 36. - № Supplement\_2. - P. S325-S330.
92. Ladova, K. Self-reported adherence by MARS-CZ reflects LDL cholesterol goal achievement among statin users: validation study in the Czech Republic / K Ladova [et al.] // Journal of Evaluation in Clinical Practice. - 2014. - Vol. 20. - № 5. - P. 671-677.

93. Dong, J. Interleukin-6 and Mevastatin Regulate Plasminogen Activator Inhibitor-1 Through CCAAT/Enhancer-Binding Protein-6 / J. Dong // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. - 2005. - Vol. 25. - № 5. - P. 1078-1084.
94. MAAS Investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS) // The Lancet. - 1994. - Vol. 344. - № 8923. - P. 633-638.
95. Pitt, B. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I): Reduction in atherosclerosis progression and clinical events / B. Pitt [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. - 1995. - Vol. 26. - № 5. - P. 1133-1139.
96. Sacks, F. Baseline characteristics in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial of secondary prevention in patients with average serum cholesterol levels / F. Sacks // The American Journal of Cardiology. - 1995. - Vol. 75. - № 8. - P. 621-623.
97. Influence of Pravastatin and Plasma Lipids on Clinical Events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) // Circulation. - 1998. - Vol. 97. - № 15. - P. 1440-1445.
98. Nadar, S. Lipid lowering in hypertension and heart protection: observations from the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT) and the Heart Protection Study / S. Nadar [et al.] // Journal of Human Hypertension. - 2002. - Vol. 16. - № 12. - P. 815-817.
99. Dai, G. Atorvastatin treatment improves effects of implanted mesenchymal stem cells: meta-analysis of animal models with acute myocardial infarction / G. Dai [et al.] // BMC Cardiovascular Disorders. - 2015. - Vol. 15. - № 1. - P. 1.
100. Ahmed, S. Acute coronary syndromes and diabetes: is intensive lipid lowering beneficial? Results of the PROVE IT-TIMI 22 trial / S. Ahmed // European Heart Journal. - 2006. - Vol. 27. - № 19. - P. 2323-2329.

- 101.** CardioPulse ArticlesNew ESC Guidelines published on stable coronary artery disease. The South African Heart Association // European Heart Journal. - 2013. - Vol. 34. - № 38. - P. 2927-2930.
- 102.** Colhoun, H. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial / H. Colhoun [et al.] // The Lancet. - 2004. - Vol. 364. - № 9435. - P. 685-696.
- 103.** Goldstein, L. Relative Effects of Statin Therapy on Stroke and Cardiovascular Events in Men and Women: Secondary Analysis of the Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) Study / L. Goldstein [et al.] // Stroke. - 2008. - Vol. 39. - № 9. - P. 2444-2448.
- 104.** Chasman, D. Pharmacogenetic Study of Statin Therapy and Cholesterol Reduction / D. Chasman [et al.] // JAMA. - 2004. - Vol. 291. - № 23. - P. 2821-2827.
- 105.** McKay, G. Association Analysis of Dyslipidemia-Related Genes in Diabetic Nephropathy / G. McKay [et al.] // PLoS ONE. - 2013. - T. 8. - № 3. - P. e58472.
- 106.** Janani C.Ranjitha Kumari, B. PPAR gamma gene – A review / B. Janani C.Ranjitha Kumari // Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. - 2015. - Vol. 9. - № 1. - P. 46-50.
- 107.** El-Lebedy, D. Apolipoprotein E gene polymorphism and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease / D. El-Lebedy, H. Raslan, A. Mohammed // Cardiovascular Diabetology. - 2016. - Vol. 15. - № 1. – P. 1-11.
- 108.** Huang Y.Mahley, R. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases / R. Huang Y.Mahley // Neurobiology of Disease. - 2014. - Vol. 72. - P. 1-25.
- 109.** Liao, F. Apolipoprotein E metabolism and functions in brain and its role in Alzheimer's disease / F. Liao, H. Yoon, J. Kim // Current Opinion in Lipidology. - 2016. - P. 1.



110. Wolters, F. Serum apolipoprotein E is associated with long-term risk of Alzheimer's disease: The Rotterdam Study / F. Wolters [et al.] // *Neuroscience Letters*. - 2016. - Vol. 617. - P. 139-142.
111. Sadee, W. Gene–Gene–Environment Interactions Between Drugs, Transporters, Receptors, and Metabolizing Enzymes: Statins, SLCO1B1, and CYP3A4 as an Example / W. Sadee [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. - 2013. - Vol. 102. - № 9. - P. 2924-2929.
112. Generaux, G. Impact of SLCO1B1(OATP1B1) and ABCG2(BCRP) genetic polymorphisms and inhibition on LDL-C lowering and myopathy of statins / G. Generaux [et al.] // *Xenobiotica*. - 2011. - Vol. 41. - № 8. - P. 639-651.
113. Солодун, М.В. Особенности гиполипидемической терапии фторвастатином при инфаркте миокарда с позиций персонализированной медицины / М.В. Солодун, С.С. Якушин // *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. – 2015. – Т.11. - № 1. – С. 31-35.
114. Berk-Planken, I. Atorvastatin Dose-Dependently Decreases Hepatic Lipase Activity in Type 2 Diabetes: Effect of sex and the LIPC promoter variant / I. Berk-Planken // *Diabetes Care*. - 2003. – Vol. 26. - № 2. - P. 427-432.
115. Kobayashi J.Mabuchi, H. Lipoprotein lipase and atherosclerosis / H. Kobayashi J.Mabuchi // *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*. - 2015. - Vol. 52. - № 6. - P. 632-637.
116. Wang, H. Gender specific effect of LIPC C-514T polymorphism on obesity and relationship with plasma lipid levels in Chinese children / H Wang // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. - 2015. - Vol. 19. - № 9. - C. 2296-2306.
117. Verdier, C. Association of Hepatic Lipase -514T Allele with Coronary Artery Disease and Ankle-Brachial Index, Dependence on the Lipoprotein Phenotype: The GENES Study / C. Verdier [et al.] // *PLoS ONE*. - 2013. - Vol. 8. - № 7. - P. e67805.
118. Lamia'a Sobhi, S. Association Between Angiotensin Converting Enzyme Gene Insertion\Deletion Polymorphism and Coronary Heart Disease in Gaza Strip / S.

- Lamia'a Sobhi [et al.] // International Journal of Biomedical Materials Research. – 2016. – Vol. 4. - № 3. – P. 18-26.
119. O'Donnell, C. Evidence for Association and Genetic Linkage of the Angiotensin-Converting Enzyme Locus With Hypertension and Blood Pressure in Men but Not Women in the Framingham Heart Study [et al.] / C. O'Donnell // Care. - 2012. - T. 35. - № 11. - С. 2324-2330.
  120. Gürlek, A. Relation between the Insertion/Deletion Polymorphism of the Angiotensin I Converting Enzyme Gene and Restenosis after Coronary Stenting / A. Gürlek [et al.] // European Journal of Cardiovascular Risk. - 2000. - Vol. 7. - № 6. - P. 403-407.
  121. Шевченко, А.В. Взаимосвязь полиморфизма гена фактора некроза опухоли альфа с риском развития метаболического синдрома и атеросклероза: автореф. дисс. ... д-ра. био. наук: 14.03.09 / Шевченко Алла Владимировна. – Новосибирск, 2015.- 41 с.
  122. Серебрякова, О.Е. Взаимосвязь полиморфизма гена фактора некроза опухоли альфа с риском развития метаболического синдрома и атеросклероза: дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.05 / Серебрякова Оксана Евгеньевна. – М., 2014.- 131 с.
  123. Затейщиков, Д.А. Ассоциация генов *TNF* и *LTA* с осложнениями атеросклероза у больных, перенесших обострение ишемической болезни сердца / Д.А Затейщиков [и др.] // Клиническая практика. – 2013. - №1. – С. 6-11.
  124. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек / М.В. Шестакова, И.И. Дедов и др. - М.: Медицинское информационное агентство, 2009. — 482 с.
  125. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфер, 2006.-312 с.

126. Герасимов, А.Н. Медицинская статистика : учебное пособие для студентов медицинских вузов / А.Н. Герасимов. - Москва: Мед. информ. агентство (МИА), 2007. - 475 с.
127. Кособян, Е.П. Вазомоторная функция эндотелия и эластичность артериальной стенки у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа на разных стадиях диабетической ретинопатии / Е.П. Кособян [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т. 58. - № 4. – С. 22-26.
128. Tolonen, H. Under-estimation of obesity, hypertension and high cholesterol by self-reported data: comparison of self-reported information and objective measures from health examination surveys / H. Tolonen [et al.] // The European Journal of Public Health. - 2014. - Vol. 24. - № 6. - P. 941-948.
129. Сычев, Д.А. Частота генотипов по аллельному варианту *SLCO1B1*\*5, ассоциированному с высоким риском развития миопатий при применении статинов, у российских пациентов с гиперлипидемиями / Д.А. Сычев [и др.] // Биомедицина. - 2011. – Т 1. - № 4. - С. 135-137.
130. Lahoz, C. Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study / C. Lahoz [et al.] // Atherosclerosis. - 2001. - Vol. 154. - № 3. - P. 529-537.
131. Zintzaras, E. Response to statin therapy among *APOE* genetic variants / E. Zintzaras [et al.] // The Pharmacogenomics Journal. – 2009. – Vol. 9. - № 4. - P. 248–257.
132. Hana, T. Association between Apolipoprotein E-polymorphism and Ischemic Heart Disease Patients With or Without Type 2 Diabetes Mellitus: A Preliminary Study in Kuwait / Al-M. T. Hana // Archives of Iranian Medicine. - Vol. 14. - № 6. – P. 385-388.
133. Araki, S. APOE polymorphism and diabetic nephropathy / S. Araki // Clinical and Experimental Nephrology. - 2013. - Vol. 18. - № 2. - P. 230-233.

134. Корбут, А.И. Терапия, основанная на инкретинах: почечные эффекты / А.И. Корбут, В.В. Климонтов // Сахарный диабет. - 2016. - Том 19. - № 1. – С. 53-63.
135. Fujita, H. The protective roles of GLP-1R signaling in diabetic nephropathy: possible mechanism and therapeutic potential / H. Fujita [et al.] // Kidney Int. – 2014. – Vol. 85. - № 3. – P. 579-589.
136. Lindsay, R.B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-  $\delta$  Genotype Influences Metabolic Phenotype and May Influence Lipid Response to Statin Therapy in Humans: A Genetics of Diabetes Audit and Research Tayside Study / R.B. Lindsay [et al.] // Clin Endocrinol Metab. – 2010. - Vol. 95. - № 4. - P. 1830–1837.
137. Castellon, R. Demystifying the ACE polymorphism: From genetics to biology / R. Castellon, H.K. Hamdi // Curr Pharm. – 2007. - Vol 13. - № 12. - P. 1191–1198.
138. Ljungberg, L. Associations of genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system with central aortic and ambulatory blood pressure in type 2 diabetic patients / L. Ljungberg [et al.] // Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. - 2013. - Vol. 15. - № 1. - P. 61-68.
139. Metta, S. Association of Angiotensin Converting Enzyme Gene Insertion / Deletion Polymorphism with Risk of Ischemic Heart Disease in A Population of Smokers in Southern India / S. Metta [et al.] // Journal Of Clinical And Diagnostic Research. - 2015. – Vol 9. - № 4. - P. GC01-GC04.
140. Lu, N. ACE2 gene polymorphism and essential hypertension: an updated meta-analysis involving 11,051 subjects / N. Lu [et al.] // Molecular Biology Reports. - 2012. - Vol. 39. - № 6. - P. 6581-6589.
141. Vangjeli, C. A polymorphism in ACE2 is associated with a lower risk for fatal cardiovascular events in females: the MORGAM project / C. Vangjeli [et al.] // Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. - 2011. - Vol. 12. - № 4. - P. 504-509.

142. Boright, A. Genetic Variation at the ACE Gene Is Associated With Persistent Microalbuminuria and Severe Nephropathy in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Genetics Study / A. Boright [et al.] // Diabetes. - 2005. - Vol. 54. - № 4. - P. 1238-1244.
143. Settin, A. Association of ACE and MTHFR genetic polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: Susceptibility and complications / A. Settin [et al.] // Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. - 2014. - Vol. 16. - № 4. - P. 838-843.
144. Hadjadj, S. Prognostic Value of the Insertion/Deletion Polymorphism of the ACE Gene in Type 2 Diabetic Subjects: Results from the Non-Insulin-Dependent Diabetes, Hypertension, Microalbuminuria or Proteinuria, Cardiovascular Events, and Ramipril (DIABHYCAR), Diabete de type 2, Nephropathie et Genetique (DIAB2NEPHROGENE), and Survie, Diabete de type 2 et Genetique (SURDIAGENE) studies / S. Hadjad [et al.] // Diabetes Care. - 2008. - Vol. 31. - № 9. - P. 1847-1852.
145. YU, Z. Meta-analysis of the relationship between ACE I/D gene polymorphism and end-stage renal disease in patients with diabetic nephropathy / Z. YU [et al.] // Nephrology. - 2012. - Vol. 17. - № 5. - P. 480-487.
146. Cherney, D. The Effect of Direct Renin Inhibition Alone and in Combination With ACE Inhibition on Endothelial Function, Arterial Stiffness, and Renal Function in Type 1 Diabetes / D. Cherney [et al.] // Diabetes Care. - 2012. - Vol. 35. - № 11. - P. 2324-2330.
147. Canani, L. The presence of allele D of angiotensin-converting enzyme polymorphism is associated with diabetic nephropathy in patients with less than 10 years duration of Type 2 diabetes / L. Canani [et al.] // Diabetic Medicine. - 2005. - Vol. 22. - № 9. - P. 1167-1172.