

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ТАШКЕНТСКИЙ ПЕДИАТРИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК.: 616.379-008.64-06:616.61-002:575.17

САЛАХОВ ТЕМУР АСКАРОВИЧ

**Клинико-диагностическое значение определения 4a/4b-
полиморфизма гена eNOS в развитии ДН при СД 2 типа узбекской
национальности.**

5A510100102- эндокринология

Диссертация написана на получение
академической степени магистра

Научный руководитель:
доцент к.м.н. Ахмедова Ш.У.

Ташкент 2013г.

АННОТАЦИЯ

На сегодняшний день сахарный диабет остается одним из наиболее распространенных, высоко затратных хронических заболеваний и является серьезной проблемой для системы здравоохранения всех стран мира.

Эпидемиология СД за последние 20 лет приобрела некоторые особенности. Процент заболеваемости СД сместился в большей степени из развитых стран Европы и США в развивающиеся страны Ближнего Востока, Азии, Африки и стран Карибского региона.

Рост распространенности СД отмечается и в Узбекистане. С 2007г. по 2010г. в Узбекистане количество зарегистрированных больных увеличилось на 15% и превысило 117 тысяч человек, что составляет 0,45% населения. Ежегодный прирост СД в Узбекистане составляет 5-6%.

Основными факторами риска развития и прогрессирования диабетических микро- и макроангиопатий являются гипергликемия, артериальная гипертония и дислипидемия. Так, повышение гликированного гемоглобина от 6% до 10% приводит к увеличению частоты ИМ у больных СД 2 типа в 2,5 раза, способствует развитию и прогрессированию диабетической нефропатии и диабетической ретинопатии (ДР) в 3,2 раза. Повышение систолического АД от 120 до 170мм рт. ст. сопровождается 2-х кратным увеличением частоты инфаркта миокарда у больных СД, 3-4 кратным увеличением ДН и ДР. Повышение уровня холестерина сыворотки крови от 5 до 7 ммоль/л в 2,5 раза увеличивает смертность больных СД от сердечно-сосудистых осложнений и также способствует развитию ДН и ДР.

АННОТАЦИЯ

Бугунги кунда кандли диабет энг куп таркалган касаллик булиб, у узига куп маблаг талаб киладиган, согликни саклаш тизими учун мухим муаммолар келтириб чиқарадиган касалликлардан бири булиб колмоқда.

Кандли диабетнинг эпидемиологияси охириги 20 йил ичида узига хос хусусиятларга эга булди. Кандли диабетнинг касалланиш фоизи ривожланган давлатлардан Европа ва АКШдан ривожланаётган давлатларга якин шарк, Осиё, Африка ва Кариб регионларига узгарди.

Кандли диабетнинг таркалганлиши Узбекистонда хам мавжуд. 2007 йдан 2010 гача Узбекистонда руйхатдан утказилган беморларнинг сони 15%га ошди ва 117 минг аҳолини ташкил этди, бу эса умумий аҳоли сонинги 0,45%ни ташкил килади. йил давомида Узбекистонда йил давомида кандли диабет таркалиши 5-6 %ни ташкил этади.

Диабетик микро- ва макроангиопатияларга олиб келувчи ва ривожланиб борувчи хавф омилларидан бири гипергликемия, артериал гипертония ва дислипидемия хисобланади. Шундай қилиб гликирланган гемоглобиннинг 6%дан 10%га кутарилиши кандли диабет 2 тип беморларда инфаркт миокард касаллигининг 2,5 маротаба, диабетик нефропатия ва диабетик ретинопатиянинг 3,2 маротаба ривожланишига олиб келади. Кандли диабетда систолик артериал кон босимининг 120дан 170мм.сим.уст. кутарилиши инфаркт миокарданинг 2 баробар, диабетик нефропатия ва диабетик ретинопатиянинг 3-4 баробар ошишига олиб келади. Кандли диабет 2 тури узбек аҳолисида eNOS генинг полиморфлиги аниқланмаган.

SUMMARY

For today, diabetes mellitus (DM) remains to be one of the most widespread, high-cost chronic diseases and is a serious problem for the public health system of all countries of the world.

For the last 20 years DM epidemiology has got some features. The percent of DM incidence shifted mostly from the developed countries of Europe and USA to the developing countries of the Middle East, Asia, Africa and the countries of the Caribbean region.

DM prevalence is increased in Uzbekistan also. From 2007 to 2010 the number of the registered in Uzbekistan patients has increased by 15% and exceeded 117,000 persons, which makes 0.45% of the population.

Annual increase of DM in Uzbekistan is about 5-6%. Major risk factors of development and progression of diabetic micro- and macroangiopathies are hyperglycemia, arterial hypertension, and dislipidemia. Thus, increase of HbA1c level from 6% to 10% leads to 2.5 times increase of MI incidence in type 2 DM patients, promotes development and progression of diabetic nephropathy (DN) and retinopathy (DR) 3.2 times. Increase of systolic BP from 120 to 170 mm Hg leads to the twice increase in incidence of MI in DM patients, threefold - fourfold increase of DN, etc. Increase of cholesterol level of blood serum from 5 to 7 mmol/l increases death rate of DM patients due to cardiovascular complications 2.5 times, and also promotes development of DN and DR.

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Концепция дальнейшего углубления демократических реформ и формирования гражданского общества в стране	12
1.2. Эпидемиология диабетической нефропатии.....	14
1.3. Классификация диабетической нефропатии. Формулировка диагноза	17
1.3. Факторы риска диабетической нефропатии	19
1.4. Роль генетических факторов в развитии диабетической нефропатии .	24
1.5. Роль полиморфизма гена eNOS в развитии ДН.	26
Выводы к главе I.....	31
ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Материалы исследования	33
2.2. Методы исследования.....	34
Выводы к главе II	44
ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1. Разработка протоколов исследования по изучению распределения генотипа генов eNOS	45
3.2. Данные по осложнениям СД у обследованных больных.....	46
3.3. Изучение распределения больных разных генотипов по возрастным группам и по стажу заболевания.	47
3.4. Изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера eNOS во взаимосвязи с анамнестическими, антропометрическими, гемодинамическими, биохимическими и функциональными показателями.	50
Выводы к III главе.....	66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	67
ВЫВОДЫ	71
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	72
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ	73
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	74
ПРИЛОЖЕНИЯ	83

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	артериальная гипертензия
АД	артериальное давление
Апо	Аполипопротеин
АПФ	ангиотензинпревращающий фермент
ДАД	диастолическое артериальное давление
ДН	диабетическая нефропатия
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПН	диабетическая полинейропатия
ДР	диабетическая ретинопатия
ИБС	ишемическая болезнь сердца
ИМ	инфаркт миокарда
ИМТ	индекс массы тела
ИзМТ	избыточная масса тела
КИМ	комплекс интима-медиа
ЛПВП	липопротеины высокой плотности
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	липопротеины очень низкой плотности
МАУ	Микроальбуминурия
НТГ	нарушенная толерантность к глюкозе
НГН	нарушенная гликемия натощак
ОТ	объем талии
ОБ	объем бедер
ПТИ	протромбиновый индекс
РАС	ренин-ангиотензиновая система
РГ	реактивная гиперемия
САД	систолическое артериальное давление
СД	сахарный диабет
СД2	сахарный диабет 2-го типа

СКФ	скорость клубочковой фильтрации
ТХУК	трихлоруксусная кислота
ТБК	тиобарбитуровая кислота
ФАК	фибринолитическая активность крови
ХПН	хроническая почечная недостаточность
ХС	Холестерин
ЧСС	частота сердечных сокращений
ЭКГ	Электрокардиография

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. На сегодняшний день сахарный диабет (СД) остается одним из наиболее распространенных, высоко затратных хронических заболеваний и является серьезной проблемой для системы здравоохранения всех стран мира. За последние 20 лет число больных СД в мире увеличилось в 6 раз, по прогнозам Международной диабетической федерации (IDF), опубликованным в 2000 году, ожидалось, что к 2010 году численность больных СД на планете достигнет 221 млн. человек, а в 2025 году СД предположительно будет иметь уже более 300 млн. человек [67]. Но численность больных СД по данным ООН за 2007 год уже составила 286 млн. человек [17]. Это означает, что к 2025 году распространенность СД в экономически развитых странах составит более 7,6%, в развивающихся более 4,9%, а общая численность достигнет 380 млн. человек [51], а к 2030 году это количество вырастет до 552 млн человек (9,9%) [67].

Эпидемиология СД за последние 20 лет приобрела некоторые особенности. Процент заболеваемости СД сместился в большей степени из развитых стран Европы и США в развивающиеся страны Ближнего Востока, Азии, Африки и стран Карибского региона. Кроме того, изменилось процентное соотношение типов СД. Если раньше процент СД 2 типа составлял 80-90%, то по данным DiabetesAtlas 2007 года эта цифра достигла 95%, кроме того, СД 2 типа стал диагностироваться и среди детей и подростков[51].

Рост распространенности СД отмечается и в Узбекистане. С 2007г. по 2010г. в Узбекистане количество зарегистрированных больных увеличилось на 15% и превысило 117 тысяч человек, что составляет 0,45% населения. Ежегодный прирост СД в Узбекистане составляет 5-6%. Эти данные не отражают действительной распространенности СД в Узбекистане. Эпидемиологические исследования распространенности СД, проведенные в Узбекистане, показывают, что истинное количество больных СД в несколько (5-6) раз выше по сравнению с зарегистрированными [3,20]. Это

свидетельствует о том, что на каждого выявленного больного СД приходится 5-6 лиц с нераспознанным СД.

Основной причиной высокой инвалидизации и смертности больных СД 2 типа вне зависимости от возраста являются: сосудистые осложнения, так называемые макроангиопатии: ишемическая болезнь сердца (ИБС), инфаркт миокарда (ИМ), сердечная недостаточность, инсульт, периферические ангиопатии в виде атеросклероза магистральных сосудов ног и диабетические микроангиопатии: нефропатия (ДН), ретинопатия (ДР), нейропатия (ДПНП). Эти осложнения развиваются в 4-6 раз чаще у больных СД 2 типа по сравнению с лицами, не страдающими СД. [49]

Основными факторами риска развития и прогрессирования диабетических микро- и макроангиопатий являются гипергликемия, артериальная гипертония и дислипидемия. Так, повышение гликированного гемоглобина от 6% до 10% приводит к увеличению частоты ИМ у больных СД 2 типа в 2,5 раза, способствует развитию и прогрессированию диабетической нефропатии (ДН) и диабетической ретинопатии (ДР) в 3,2 раза [32,37]. Повышение систолического АД от 120 до 170 мм рт. ст. сопровождается 2-х кратным увеличением частоты инфаркта миокарда у больных СД, 3-4 кратным увеличением ДН и ДР [50]. Повышение уровня холестерина сыворотки крови от 5 до 7 ммоль/л в 2,5 раза увеличивает смертность больных СД от сердечно-сосудистых осложнений [64] и также способствует развитию ДН и ДР.

В большинстве развитых стран мира СД занимает 3-4 место в структуре смертности, является ведущей причиной инфарктов миокарда, хронической почечной недостаточности (ХПН), слепоты, ампутаций у взрослого населения [27,63]. Показатели смертности больных вызывают много споров и далеки от истинных, так как эти больные умирают не от самого диабета, а от осложнений диабета и входят в число умерших от сердечно-сосудистой патологии и ХПН, что значительно снижает цифры смертности от СД.

В последние годы, сосудистые осложнения диабета 2 типа выявляются не только у вновь выявленных больных сахарным диабетом, но даже у лиц с промежуточными гипергликемиями (НГН, НТГ). К моменту клинической манифестации СД типа 2 около 50% больных уже имеют различные макрососудистые осложнения. По данным Каюмовой ИБС уже в 42% случаев обнаруживается сразу при первом выявлении СД 2 типа, а ДР 15,1% и ДН 4,2% [9]

Но по данным международных эпидемиологических исследований ХПН встречается в 5-22% [60, 65], слепота до 3-5% [67], фатальный инфаркт миокарда до 10% [10], по данным Национального регистра по СД, проведенного в Узбекистане в 2007 году [4], причиной смерти у больных с СД был ИМ в 6,0%, ХПН в 10,8%, а слепота зарегистрирована у 1,7%, т.е. конечные стадии микро- и макроангиопатий, которые приводят к выраженной инвалидизации и смертности развиваются только у 2-22% больных СД 2 типа. Следовательно, кроме метаболических, иммунологических и гемодинамических факторов, существуют наследственные, молекулярно-генетические факторы, определяющие развитие и прогрессирование или наоборот, протекцию сосудистых осложнений при СД.

Поиск генетических маркеров предрасположенности или, напротив, устойчивости к заболеваниям – одна из наиболее актуальных задач медицинской науки. Это определяется тем, что установление таких маркеров открывает возможность клиницистам формировать группы риска развития заболеваний, а при некоторых патологиях устанавливать индивидуальный прогноз или диагноз (в том числе до клинической манифестации заболеваний). Оценка роли того или иного генетического маркера при СД зависит от расово-этнических вариаций частот встречаемости аллелей и генотипов в исследованных популяциях [30,68]. В последние годы в литературе широко обсуждается генетический риск развития СД и его осложнений в зависимости от генов инсулинорезистентности, генов

определяющих пониженный уровень инсулина, полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) у пациентов с обоими типами сахарного диабета [14,16].

Известно, что ген эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) участвует в синтезе NO эндотелием и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления. NO, возможно, имеет значение и в патогенезе ИБС, поскольку угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток, а также обладает протекторным эффектом в отношении агрегации тромбоцитов и ингибирует адгезию лейкоцитов к эндотелию. Подавление или снижение активности eNOS приводит к недостатку оксида азота — дисфункции эндотелия, которой согласно классической теории «ответ на повреждение» отводится основная роль в инициации атерогенеза, а также развитии атеротромбоза [46,55,56,53].

Мета-анализ оценки связи между аллелями 4a и 4b гена eNOS проведенные в подгруппах по признаку этнической принадлежности дали основание предположить, что 4a/4b полиморфизм в гене eNOS ассоциируется с восприимчивостью к ДН в азиатских, но не в кавказоидных популяциях [48].

Полиморфизм гена eNOS, узбекской национальности у больных СД2 не исследовался.

Цель. Изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера гена eNOS, у здоровых и при СД 2 типа узбекской национальности во взаимосвязи с анамнестическими, антропометрическими, гемодинамическими, биохимическими и функциональными показателями и оценка роли полиморфизма гена eNOS в риске развития диабетической нефропатии при СД 2 типа узбекской национальности.

Задачи исследования:

- Изучение распределения частот генотипов 4a/4b полиморфного маркера гена eNOS у здоровых и при СД 2 типа.

- Изучение взаимосвязи факторов риска развития и прогрессирования ДН при СД 2 типа в взаимосвязи от генотипов 4a/4b гена eNOS.
- Клинико-метаболические факторы риска развития и прогрессирования ДН при СД 2 типа в ассоциации от генотипов 4a/4b гена eNOS
- Оценка роли полиморфизма гена eNOS в риске развития диабетической нефропатии при СД 2 типа узбекской национальности.

Научная новизна. Выявлены наиболее значимые факторы риска, такие как высокая частота несбалансированного питания, артериальная гипертензия, ожирение и другие, в развитии сахарного диабета 2 типа и его сосудистых осложнений у мужчин узбекской национальности. Выявлена связь между 4a/4b полиморфизмом в гене eNOS с сосудистыми осложнениями при СД 2 типа у данных обследованных больных.

Практическая значимость. Поиск генетических маркеров предрасположенности или, напротив, устойчивости к заболеваниям – одна из наиболее актуальных задач медицинской науки. Это определяется тем, что установление таких маркеров открывает возможность клиницистам формировать группы риска и прогнозирования развития как самого заболевания, так и его осложнений, а при некоторых патологиях устанавливать индивидуальный прогноз или диагноз (в том числе до клинической манифестации заболеваний). У подавляющего большинства больных, включенных в исследование, диагностировалась диабетическая нефропатия, диабетическая полинейропатия, ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия, реже – диабетическая ретинопатия, диабетическая энцефалопатия, хроническая сердечная недостаточность и инфаркт миокарда.

Личный вклад автора. Магистром самостоятельно осуществлялся набор пациентов, клиническое, инструментальное и лабораторное их

обследование, заполнение соответствующих и специально разработанных для данного исследования учетных форм и клинических карт. Автор принимал активное участие в проведении генетического исследования, при анализе и обобщении полученных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту 1. Большинство пациентов с сахарным диабетом 2 типа с генотипом 4a4b имели относительно тяжёлую стадию нефропатии, следовательно 4a4b генотип гена eNOS по предварительным данным имеет клинико-диагностическое значение в развитии ДН и ХПН при СД 2 типа узбекской национальности.

2. Поиск генетических маркеров предрасположенности или, напротив, устойчивости к заболеваниям открывает возможность клиницистам формировать группы риска развития заболеваний, а при некоторых патологиях устанавливать индивидуальный прогноз или диагноз (в том числе до клинической манифестации заболеваний).

Внедрение в практику. Внедрен Протокол 1 для изучения распределения генотипов генов eNOS при СД2 и Протокол 2 для изучения генотипов указанных генов у практически здоровых мужчин узбекской национальности в клинике РСНПМЦЭ.

Апробация диссертации. Материалы диссертации доложены на семинаре проводившейся для врачей, резидентов магистратуры, клинических ординаторов на базе РСНПМЦ Эндокринологии 18 апреля 2013 года, а также на конференции молодых ученых посвящённой проблемам эндокринологии проведенной в академии наук в ноябре 2012года.

Структура диссертации. Диссертация написана на 80 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3х глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка опубликованных работ, списка используемой литературы, к каждой главе написаны выводы, имеются аннотации на русском и английском языках, в подглаве 1 написаны

фрагменты работы президента И.А.Каримова, которые были связаны с медициной Узбекистана. В диссертации имеются 8 таблицы, 12 рисунков.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 печатных работ.

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Концепция дальнейшего углубления демократических реформ и формирования гражданского общества в стране

Как известно, Узбекистан после достижения независимости в 1991 году, отказавшись от изжившей себя тоталитарной административно-командной, планово-распределительной системы избрал собственную «узбекскую модель» развития (И.А. Каримов 2010 г) [1]

В докладе Президента Республики Узбекистан Ислама Каримова на совместном заседании Законодательной палаты и Сената Олий Мажлиса Республики Узбекистан, были отражены суть и содержание разработанной и реализуемой сегодня модели - это кардинальное изменение и обновление государственного и конституционного устройства, реализация политических, экономических и социальных реформ, базирующихся на таких принципах, как деидеологизация экономики и её приоритет над политикой, возложение на государство роли главного реформатора, то есть функции инициатора и координатора реформ, обеспечение верховенства закона, осуществление сильной социальной политики, поэтапность и постепенность проводимых реформ.[2]

И.А. Каримов в своём докладе также подчеркнул, что в век глобализации и всё более усиливающейся конкуренции мы обязаны реально и самокритично оценить своё место в происходящих сегодня в мире кардинальных переменах, идти в ногу с растущими требованиями времени.[2]

Жизнь никогда не стоит на месте и выигрывает та страна, тот народ, который имеет глубоко продуманную программу и стратегию её реализации, имеющую чёткие ориентиры и приоритеты, и что особенно важно работающую на упреждение возможных кризисов и различных катаклизмов, взлётов и падений мировой экономики.[1]

Совершенствование оказания медицинской помощи детскому населению Узбекистана всегда рассматривалось не только с позиций внедрения в широкую практику новейших медицинских технологий диагностики, профилактики и лечения, но и состояния кадрового обеспечения учреждений здравоохранения.

Во исполнение задач «Национальной программы по подготовке кадров» в свете выполнения государственной программы по дальнейшему реформированию системы здравоохранения и в соответствии с Законом «Об образовании» в Республике Узбекистан подготовка педиатрических кадров осуществляется по двухуровневой системе (додипломное и постдипломное образование).[1]

Основной целью существующей системы подготовки педиатров является улучшение состояния кадрового обеспечения учреждений здравоохранения для оказания детям и подросткам доступной, качественной, высококвалифицированной, своевременной медицинской помощи, улучшение состояния здоровья общества в целом и каждого гражданина в отдельности.

Государственные программы и документы в области охраны здоровья матерей и детей, регламентирующие также вопросы стимулирования грудного вскармливания, контроля дефицита жизненно важных микроэлементов, постоянного мониторинга роста и развития детей, пропаганда здорового образа жизни среди общества, а также ряд инициатив по продовольственной безопасности, внесли и вносят большой вклад в улучшение качества жизни населения Узбекистана. [2]

В республике созданы основы законодательной и нормативной базы в области безопасности и качества пищевой продукции. Приняты Законы «О сертификации продукции», «О санитарно-эпидемиологическом надзоре», «О профилактике заболеваний, вызванных дефицитом йода», в соответствии с которыми, каждому жителю страны гарантированы права на сохранение и

укрепление здоровья, улучшения питания. Внесен на рассмотрение в Олий Мажлис Закон «О профилактике микронутриентной недостаточности».

В настоящее время в Узбекистане успешно действуют программы по профилактике и ликвидации дефицита микронутриентов: йодизация соли, саплементация железом и витамином А среди целевых групп населения, фортификация муки железом.[2]

В результате реализации вышеуказанных программ в республике достигнуты определенные успехи в росте и развитии, в целом в здоровье детей. По данным мульти индикаторных кластерных исследований (МИКИ-2006), по всем трем индикаторам нарушения питания среди детей первых 5 лет жизни за последние десять лет наблюдается значительное улучшение ситуации. Доля детей с пониженной массой тела снизилась с 19 до 5 процентов, с отставанием в росте – с 31 до 15 процентов, с истощением – с 12 до 3 процентов. Необходимо отметить, что существенные успехи достигнуты среди детей, проживающих в сельской местности. Данные показатели свидетельствуют о том, что со стороны Президента и Правительства Узбекистана проводится планомерная работа по обеспечению благосостояния и развития села.[2]

1.2 Эпидемиология диабетической нефропатии.

Под термином «диабетическая нефропатия» (ДН) понимают специфическое поражение почек при сахарном диабете (СД), сопровождающееся формированием узелкового и диффузного гломерулосклероза, терминальная стадия которого характеризуется развитием хронической почечной недостаточности (ХПН).

С увеличением продолжительности жизни больных диабетом она становится все более актуальной проблемой в ряду поздних осложнений заболевания, вызывающих раннюю инвалидизацию и смертность. По потребности в лечении гемодиализом и трансплантации почек больные диабетом прочно удерживают лидерство в развитых странах. [3]

В России вопросы оказания помощи больным СД на стадии терминальной почечной недостаточности (ТПН) стоят чрезвычайно остро. По данным Государственного регистра больных СД на 2002 г., только 18 из 89 регионов и областей России хотя бы отчасти обеспечивают больных СД заместительными методами терапии почечной недостаточности: гемодиализом, реже - перитонеальным диализом, в единичных центрах - трансплантацией почки. По данным Российского регистра больных с ХПН на 31.12.2005 г. доля больных СД с ТПН, получавших лечение программным гемодиализом, составляла 7,9% (из них 74,6% - больные СД 1 типа и только 25,4% - больные СД 2 типа) при реальной потребности 30-40%. Пятилетняя выживаемость больных СД, впервые начавших лечение гемодиализом в 2000-2005 гг., была наиболее низкая по сравнению с другими нозологическими группами и составила 40,0%, а в возрастной группе старше 65 лет - 35,5%. Следует отметить, что Регистр Российского диализного общества не дает представления об истинной распространенности ТПН в национальности больных СД 2 типа в стране, так как значительная часть этих больных не получает заместительной почечной терапии (ЗПТ), и поэтому не попадает в регистр. Еще менее учтенной и исследованной остается когорта больных СД с начальной и умеренной ХПН, что затрудняет прогнозирование динамики распространенности ТПН и потребности в ЗПТ. [3]

Частота развития ДН при СД 1 типа находится в тесной зависимости от длительности заболевания и от возраста, в котором дебютировало заболевание. Она максимальна у лиц с развитием диабета в пубертатном возрасте (44-45%), несколько снижается при дебюте после 20 лет (30-35%), не превышает нескольких процентов при дебюте заболевания после 35 лет. Вероятно, это определяется проблемами компенсации метаболических нарушений при патологическом воздействии на почки гормональной перестройки организма в пубертатный период. [3, 4]

Мало изученными вопросами диабетологии остаются поражение почек у больных СД 2 типа и факторы, определяющие темпы прогрессирования

данного осложнения. Это тем более тревожно, что распространенность почечной недостаточности нарастает особенно очевидно за счет больных СД 2 типа. Ежегодные расходы на лечение больных СД 1 типа с ДН в США исчисляются в 1,9 млрд долларов, тогда как на лечение больных СД 2 типа с ДН - в 15 млрд долларов. По данным USRDS (US RenalDataSystem - Объединенной системы данных о донорских почках США), количество пациентов, нуждающихся в диализе в этой стране, прогнозируется порядка 520240 в 2010 году, и 50% от этого количества будут составлять больные СД (преимущественно 2 типа). Сопоставимые данные получены в европейских странах. [3]

В России, по данным Государственного регистра больных сахарным диабетом, распространенность ДН при СД 2 типа в среднем составляет 8%, что ниже мировых значений в 5 раз. Активный скрининг больных СД 2 типа установил, что истинная распространенность ДН превышает зарегистрированную в различных регионах России в 2-8 раз.

По данным Национального регистра по СД, проведенного в Узбекистане в 2007 году[4], причиной смерти у больных с СД был ИМ в 6,0%, ХПН в 10,8%, а слепота зарегистрирована у 1,7%, т.е. конечные стадии микро- и макроангиопатий, которые приводят к выраженной инвалидизации и смертности развиваются только у 2-22% больных СД 2 типа.[3]

По данным Каюмовой ИБС уже в 42% случаев обнаруживается сразу при первом выявлении СД 2 типа, а ДР 15,1% и ДН 4,2% [9]

Важно отметить, что наряду с классическим диабетическим гломерулосклерозом у больных СД 2 типа часто развивается поражение почек недиабетического генеза: хронический пиелонефрит, почечнокаменная болезнь, хронический гломерулонефрит, ишемическая нефропатия, уратная нефропатия, анальгетическая нефропатия. Возможность сочетания нескольких форм нефропатии у одного человека значительно повышает риск необратимого ухудшения функции почек.

Установлено, что у пациентов с впервые выявленным СД 2 типа микроальбуминурия (МАУ) обнаруживается уже в 15-40% случаев, протеинурия - в 7-10% и ХПН - в 1%, что отражает трудности диагностики заболевания. При относительно точном определении времени дебюта СД 2 типа прослеживается такая же, как и при СД 1 типа, зависимость частоты развития ДН от длительности заболевания: 7-10% при длительности диабета 5 лет, 20-35% при длительности 20-25 лет, и 50-57% при более длительных сроках течения болезни. [3]

1.3. Классификация диабетической нефропатии. Формулировка диагноза

Впервые детальная классификация стадий ДН была разработана датским исследователем СЕ. Mogensen в 1983 г., согласно которой выделяют две доклинические и три клинические стадии развития ДН. Доклинические стадии в развитии ДН характеризуются функциональными и структурными изменениями почек при отсутствии типичных признаков почечной патологии. К этим стадиям относятся стадия гиперфльтрации (повышение СКФ более возрастной нормы) и стадия начальных структурных изменений ткани почек (утолщение базальных мембран клубочков, расширение мезангиального матрикса). Эти изменения можно обнаружить в первые 5 лет от дебюта СД, однако в реальной клинической практике столь ранние и, как правило, обратимые нарушения не являются значимыми для диагностики ДН. К клиническим этапам развития ДН относятся стадии начинающейся ДН (характеризуется появлением МАУ), стадия выраженной ДН (соответствует появлению протеинурии) и стадия хронической почечной недостаточности.

До последнего времени в Российской Федерации используется классификация ДН, утвержденная МЗ РФ в 2000 г., включающая следующие формулировки:

- Диабетическая нефропатия, стадия микроальбуминурии;
- Диабетическая нефропатия, стадия протеинурии с сохранной азотвыделительной функцией почек;

- Диабетическая нефропатия, стадия хронической почечной недостаточности.

В то же время, учитывая принятие новой классификации хронической болезни почек (ХБП), предложенной Национальным почечным фондом США в 2002 г., в настоящее время требуется коррекция формулировки диагноза ДН с указанием стадии ХБП, поскольку к стадиям «микроальбуминурии» и «протеинурии» могут относиться пациенты с различным уровнем СКФ (таблица 1). Кроме того, нередко встречаются пациенты с СД и сниженной СКФ без МАУ, протеинурии и других лабораторных признаков поражения почек, однако низкий уровень СКФ требует у таких лиц особого внимания и отражения его в диагнозе.

Стадии ХБП у больных СД

СКФ [мл/мин/1,73 ма)	Больные сахарным диабетом	
	С лабораторными признаками поражения почек	Без признаков поражения почек
>90	1	Норма
89-60	2	Норма
59-30	3	3
29-15	4	4
<15 или диализ	5	5

Уровень СКФ в настоящее время признан лучшим методом оценки функции почек в целом как у здоровых лиц, так и при различных заболеваниях. Нормальный уровень СКФ соотносится с возрастом, полом, поверхностью тела. Для определения уровня СКФ используют расчетные методы: для взрослых формулы Cockcroft-Cault и MDRD, для детей - формулы Schwartz и Counahan.

Формула Cockcroft-Cault:

$$СКФ = [(140 - \text{возраст(годы)}) \times \text{масса тела[кг]}] / 72 \times \text{креатинин крови (мкмоль/л)} \times 0,85 (\text{для женщин})$$

Формула MDRD:

$СКФ = 186 \times (\text{креатинин сыворотки})^{1,154} \times (\text{возраст})^{0,203} \times 0,742$
(для женщин) \times
 $\times 1,210$ (для представителей негроидной расы)

Первая формула основана на клиренсе креатинина, а вторая - на клиренсе йоталамата. Результат расчета СКФ по формуле Cockcroft-Cault превышает таковой по формуле MDRD, поскольку креатинин в отличие от йоталамата выделяется не только путем фильтрации, но и секреции, поэтому клиренс креатинина всегда превышает клиренс йоталамата.

Расчет СКФ по клиренсу креатинина с мочой (проба Реберга) в настоящее время широко не используется, поскольку этот метод не улучшает оценку СКФ по сравнению с рассчитанной по формуле и нередко сопровождается погрешностями при сборе мочи. Сбор мочи за 24 часа необходим для расчета СКФ у лиц, придерживающихся вегетарианской диеты, со сниженной мышечной массой, а также для оценки диеты и нутритивного статуса, определения необходимости начала диализа.

В норме значения СКФ у женщин на 8% ниже, чем у мужчин во всех возрастных группах. После 30 лет уровень СКФ снижается со средней скоростью около 1 мл/мин/1,73 м² в год.

Таким образом, после принятия в Российской Федерации классификации ХБП диагноз ДН будет звучать следующим образом:

- ДН, стадия микроальбуминурии, ХБП 1 (2, 3 или 4);
- ДН, стадия протеинурии, ХБП 2 (3 или 4);
- ДН, ХБП 5 (лечение программным гемодиализом).

1.3. Факторы риска диабетической нефропатии

Длительное время велись дебаты о специфичности проявления ДН при СД 1 и 2 типа. В настоящее время достаточно убедительны свидетельства, что базовые патофизиологические механизмы, ведущие к развитию и прогрессированию ДН, одинаковы при обоих типах диабета.

Гипергликемии отводится ведущая роль в развитии микро- и макрососудистых осложнений. Сегодня не вызывает сомнения необходимость достижения оптимального контроля гликемии для профилактики развития и нарастания тяжести ДН. Наиболее крупным исследованием, подтвердившем возможность предотвращения развития ДН у больных СД 1 типа при идеальной компенсации углеводного обмена, явилось исследование DCCT (Diabetes Control and Complication Study). У хорошо компенсированных больных на интенсивной инсулинотерапии риск развития МАУ был на 34%, а протеинурии на 43% ниже, чем в группе больных на традиционной инсулинотерапии. По данным аналогичного исследования среди больных СД 2 типа - UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), интенсивная тактика контроля гликемии у больных СД 2 типа, позволившая снизить гликированный гемоглобин до 7,0%, достоверно уменьшает частоту альбуминурии на 33%. Результаты недавно завершившегося исследования ADVANCE (The Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation) у больных с СД 2 типа также подтверждает этот факт. Достижение целевого уровня гликированного гемоглобина 6,5% позволило снизить частоту возникновения и прогрессирования нефропатии на 21%. Компенсация углеводного обмена, играющая ключевую роль на начальных стадиях заболевания, продолжает сохранять свое значение даже на далеко зашедших стадиях осложнения. Больные СД с неудовлетворительным контролем гликемии в период, предшествующий началу диализа, имеют худший прогноз, чем пациенты с компенсацией углеводного обмена. Неадекватный гликемический контроль у больных на стадии ХПН чреват склонностью к инфекционным осложнениям, может приводить к резкому увеличению объема внеклеточной жидкости, включая механизм жажды. Жесткий контроль гликемии, начиная с дебюта СД и на протяжении всего заболевания, важен в предотвращении развития и прогрессирования почечных осложнений. [3]

Гиперлипидемия - другой метаболический фактор прогрессирования ДН. Пациенты с СД имеют комплексные липидные нарушения: сниженный уровень липидов высокой плотности (ЛПВП), повышенный уровень триглицеридов (ТГ), липидов низкой плотности (ЛПНП), особенно выраженные при ДН. В отличие от больных СД 1 типа оптимальная компенсация углеводного обмена у больных СД 2 типа не приводит к нормализации дислипидемии. Это, по всей видимости, объясняет тот факт, что даже при отсутствии гипергликемии у больных с нарушенной толерантностью к углеводам, дислипидемия - одна из составляющих метаболического синдрома.

Установлено существование полной аналогии между процессом формирования гломерулосклероза и механизмом развития атеросклероза сосудов. Этому способствует структурное сходство мезангиальных клеток клубочков с гладкомышечными клетками артерий. С другой стороны, почечная патология приводит к развитию гиперлипидемии. В последние годы роль гиперлипидемии в развитии и прогрессировании ДН четко установлена.

Протеинурия чаще всего рассматривается в качестве важнейшего негемодинамического предиктора прогрессирования ДН. Сформулированная исследователями Джослинского Диабетического Центра протеинурическая гипотеза рассматривает три постулата:

- высокий уровень протеинурии - фактор быстрого прогрессирования ДН;
- снижение протеинурии коррелирует с медленным прогрессированием ДН;
- протеинурия - суррогатная конечная точка и цель терапевтической интервенции у больных с ДН.

Исследование RENAAL

(Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan study), включавшее пациентов с СД 2 типа и ДН на стадии начальной ХПН, показало

протеинурию в качестве наиболее значимого фактора риска кардиоваскулярных событий и прогрессирования ДН независимо от уровня АД. Другими факторами прогрессирования ДН среди анализируемых 23 оказались уровень креатинина сыворотки, гипоальбуминемия, анемия.

Таким образом, протеинурия является одновременно и следствием развивающейся ДН, и фактором ее прогрессирования. Поэтому редукция протеинурии менее чем 1 г/сут является такой же важной целью лечения, направленного на предотвращение прогрессирования ДН, как и достижение целевых показателей гликемии, АД, липидов сыворотки крови.

Артериальная гипертензия (АГ) играет ключевую роль в развитии и прогрессировании ДН так же, как и в развитии макроваскулярной патологии. По мере прогрессирования ДН роль метаболических факторов снижается и возрастает роль АГ. Предупредить развитие и прогрессирование сосудистых осложнений (в том числе и ДН) возможно только при поддержании АД на уровне не более 130/80 мм рт. ст. Более жесткий контроль АД у лиц с почечной патологией может привести к гипоперфузии других органов-мишеней. При СД 1 типа генез АГ на 80-90% связан с развитием ДН. Она наблюдается у 35-40% больных СД 1 типа. АГ при СД 1 типа носит На-зависимый и объемзависимый характер. В отличие от больных СД 1 типа у больных СД 2 типа АД уже повышено до развития ДН. У 80% больных СД 2 типа в момент диагностики заболевания амбулаторный контроль выявляет повышенное АД или его нарушенный циркадный профиль. Развившаяся ДН усиливает АГ следующими механизмами:

- задержка натрия;
- чрезмерная активация РААС (ренин-ангиотензиноподостероновая система), по крайней мере локальной в почках;
- симпатическая гиперактивация;
- замедление эндотелий зависимой вазодилатации.

Эти механизмы определяют выбор антигипертензивных средств ИАПФ (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента), блокаторы рецепторов

ангиотезина II (БРА), петлевые диуретики, блокаторы симпатической системы.

Анемии как важному фактору прогрессирования ДН уделяется большое внимание в последние годы. В популяционном исследовании КЕЕР (KidneyEarlyEvaluationProgram) анемия была определена у 30% пациентов с СД с почечной патологией, что в 2 раза превышала ее распространенность среди пациентов без СД (14%). Аналогичные данные были получены в клиническом исследовании PAERI (PrevalenceofAnemiainEarlyRenalInsufficiency). Распространенность анемии среди больных с диабетом и почечной патологией и без диабета составила 52.7% и 39.4% соответственно. Наиболее важная причина анемии у больных СД с ДН - снижение продукции эритропоэтина в перитубулярных клетках проксимальной части нефрона. Анемия превалирует у больных с ДН, она ассоциирована с сердечно-сосудистыми заболеваниями, ретинопатией; развивается задолго до нарушения фильтрационной функции почек (возможно, уже на стадии МАУ как проявление автономной нейропатии).

Таким образом, анемия как одно из серьезных осложнений ДН одновременно является и фактором ее прогрессирования, требующим патогенетической заместительной терапии на самых ранних стадиях.

Курение как независимый фактор риска развития и прогрессирования ДН определяется во многих клинических исследованиях как при СД 1 типа, так и СД 2 типа. Курение повышает риск развития МАУ, ускоряет темпы прогрессирования ДН до стадии протеинурии и ХПН. Курение при остром воздействии ведет к активации симпатической нервной системы, влияя на АД и почечную гемодинамику. Хроническое воздействие приводит к дисфункции эндотелия - подавлению продукции оксида азота и эндотелий зависимой вазодилатации, а также к гиперплазии клеток интимы сосудов.

Как было установлено, частота развития ДН у пациентов с СД увеличивается в зависимости от выкуриваемых сигарет и наибольшая при потреблении в день свыше 30 сигарет. Частота прогрессирования МАУ в

стадию протеинурии среди курящих больных СД в 2,5 раза выше, чем в группе некурящих.

Диабетическая ретинопатия (ДР) обнаруживается почти в 90% случаев у больных СД 1 типа с протеинурией. Частота ее выявления зависит в основном, как и частота ДН, от длительности заболевания и качества компенсации. У больных СД 2 типа с протеинурией ДР выявляется реже - примерно у 50%. Это может отражать наличие в почках патологических процессов, не зависящих от эффектов гипергликемии, а также различное время развития их и дифференцированный ответ на воздействие факторов, влияющих на прогрессивное снижение почечной функции. В исследовании RENAAL наличие ДР в качестве одного из базовых показателей ассоциировалось с более значимым риском прогрессирования почечной патологии - удвоения креатинина крови, достижения терминальной стадии ХПН. Сильнейшая корреляция между наличием ДР и достижением терминальной ХПН у больных СД 2 типа была подтверждена еще в ряде крупных исследований. Полученные данные позволяют рассматривать ДР у больных СД 2 типа как важный фактор риска прогрессирования почечной патологии и требуют мониторинга состояния глазного дна. [3]

1.4. Роль генетических факторов в развитии диабетической нефропатии

Риск развития нефропатии определенно детерминирован генетическими факторами. Только приблизительно у 40-50% пациентов как с СД 1 типа, так и СД 2 типа в последующем развивается ДН. Генетические факторы могут непосредственно влиять на развитие ДН и/или действовать совместно с генами, влияющими на сердечно-сосудистые заболевания. Поиск генетических маркеров предрасположенности или, напротив, устойчивости к заболеваниям – одна из наиболее актуальных задач медицинской науки. [20]

Это определяется тем, что установление таких маркеров открывает возможность клиницистам формировать группы риска развития заболеваний, а при некоторых патологиях устанавливать индивидуальный прогноз или диагноз (в том числе до клинической манифестации заболеваний). Оценка

роли того или иного генетического маркера при СД зависит от расово-этнических вариаций частот встречаемости аллелей и генотипов в исследованных популяциях [30,68]. В последние годы в литературе широко обсуждается генетический риск развития СД и его осложнений в зависимости от генов инсулинорезистентности, генов определяющих пониженный уровень инсулина, полиморфизма гена ангиотензин-1-превращающего фермента (АСЕ), гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) у пациентов с обоими типами сахарного диабета [14,16].

В настоящее время известно, что эндотелий регулирует сосудистый тонус через освобождение сосудорасширяющих и сосудосуживающих факторов и модулирует сократительную активность гладкомышечных клеток.

К эндотелиальным факторам дилатации относится и оксид азота (NO). NO является основным вазодилататором, препятствующим тоническому сокращению сосудов нейронального, эндокринного или локального происхождения. В физиологических условиях NO постоянно вовлечен в адаптацию сосудистой системы к повышенным метаболическим потребностям, физическим нагрузкам. При заболеваниях избыток NO отвечает за увеличение периферической вазодилатации, а недостаток NO может приводить к тяжелым заболеваниям, включая артериальную гипертонию, ишемическую болезнь сердца и атеросклероз (также сосудов гломерулярного аппарата почек).[22]

NO предотвращает адгезию и агрегацию тромбоцитов, адгезию моноцитов, влияет на структуру сосуда, что защищает сосудистую стенку и предотвращает ремоделирование сосудов при различных патологических состояниях. Оксид азота образуется под действием фермента NO-синтазы (NOS). NO-синтаза существует в виде трех основных изоформ, которые получили свое название по типу клеток, в которых они были впервые обнаружены: нейрональная NO-синтаза (nNOS или NOS I), эндотелиальная NO-синтаза (eNOS или NOS III) и NO-синтаза макрофагов или

индуцибельная NO-синтаза (iNOS или NOSII). Нейрональная и эндотелиальная NO синтазы являются ферментами со стабильной активностью, в то время как активность макрофагальной или индуцибельной NO-синтазы в большей степени регулируется цитокинами. Эндотелиальная NO-синтаза стабильно экспрессируется в эндотелиальных клетках.[34]

Ингибирование NO-синтазы приводит ко всем органическим последствиям тяжелой и продолжительной артериальной гипертензии, включая атеросклероз и сосудистые органические поражения.[21]

1.5. Роль полиморфизма гена eNOS в развитии ДН.

Ген eNOS локализован в 7 хромосоме и кодирует белок, состоящий из 1203 аминокислот. В экзонах и интронах гена eNOS обнаружено несколько полиморфных участков, среди которых наиболее изучены два, а именно мини-сателлитный повтор в интроне 4 (eNOS 4a/4b полиморфизм) и мутация в положении 298 белковой последовательности, ведущая к замене остатка глутаминовой кислоты на аспарагиновую (Glu298Asp).

Ген eNOS локализован в хромосоме 7q35-36 и кодирует белок с мол. массой 135 кД, состоящий из 1203 аминокислот [20]. Наиболее мощным регулятором экспрессии eNOS является напряжение сдвига, связанное с воздействием потока крови на поверхность эндотелиальных клеток [21, 22]. В экзонах и интронах гена eNOS обнаружено несколько полиморфных участков, среди которых наиболее изучены два, а именно мини-сателлитный повтор в интроне 4 (eNOS 4a/4b полиморфизм) [23] и мутация в положении 298 белковой последовательности, ведущая к замене остатка глутаминовой кислоты на аспарагиновую (Glu298Asp) [24].

Мини-сателлит 4a/4b в 4-м интроне гена eNOS насчитывает 2 аллеля, состоящих из 4 или 5 tandemных повторов размером 27 пар нуклеотидов. Аллель 4a гена eNOS включает четыре повтора и короче аллеля 4b на 27 пар нуклеотидов [25].

В европейской популяции аллель 4b гена eNOS встречается значительно чаще, чем аллель с 4 повторами. Распределение частот аллелей в

популяции составляет соответственно 4b/4b – 0,41, 4b/4a – 0,46 и 4a/4a – 0,13. У австралийских европеоидов и японцев, гомозиготных по аллелю eNOS4a, уровень нитратов и нитритов в крови, напрямую связанный со скоростью выработки NO эндотелием сосудов, достоверно выше, чем у лиц с генотипом 4b/4b, что свидетельствует о потенциальной роли генотипа 4a/4a как фактора риска развития заболеваний, сопровождающихся нарушением нормальной выработки окиси азота [26]. Этот полиморфизм ассоциирован с повышением уровня циркулирующих нитратов и нитритов и у здоровых людей [27]. Четко прослеживается связь между уровнем продукции NO в организме и выраженностью окислительного стресса при сосудистой патологии: ингибирование синтеза и резкое снижение содержания NO в кровяном русле связано с накоплением свободных радикалов кислорода и перекисей. У гомозиготных носителей аллеля 4a гена eNOS [28] выявлено достоверно более низкое содержание внеклеточной супероксиддисмутазы (одного из ферментов антиоксидантной защиты).

Показаны достоверно более высокое содержание аллеля 4a и частота генотипа 4a/4a среди японцев, страдающих гипертонией и перенесших инфаркт миокарда [29, 30].

При анализе частот аллелей в группах больных ГБ и здоровых людей достоверных различий не обнаружено [31]. Однако при выделении группы больных с артериальной гипертонией и гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ) частота встречаемости аллеля 4a была достоверно выше, чем в группе здоровых людей [32].

Нормальный вариант содержит 5 повторов (обозначается как 4b), мутантный вариант содержит 4 повтора (4a). Влияние варианта 4a связано с нарушением экспрессии гена NOS3, что приводит к уменьшению выработки NO. Для данного варианта описаны ассоциации с атеросклерозом, ишемической болезнью сердца и инфарктом миокарда. Установлено, что риск атеросклеротического поражения коронарных артерий повышен у

курильщиков. У больных диабетом 2 типа наличие варианта 4a является фактором риска гипертонии.

Четко прослеживается связь между уровнем продукции NO в организме и выраженностью окислительного стресса при сосудистой патологии: ингибирование синтеза и резкое снижение содержания оксида азота в кровяном русле связано с накоплением свободно-радикальных молекул. У гомозиготных носителей аллеля 4a гена eNOS выявлено достоверно более низкое содержание внеклеточной СОД.

Известно, что ген эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) участвует в синтезе NO эндотелием и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления. NO, возможно, имеет значение и в патогенезе ИБС, поскольку угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток, а также обладает протекторным эффектом в отношении агрегации тромбоцитов и ингибирует адгезию лейкоцитов к эндотелию. Подавление или снижение активности eNOS приводит к недостатку оксида азота — дисфункции эндотелия, которой согласно классической теории «ответ на повреждение» отводится основная роль в инициации атерогенеза, а также развитии атеротромбоза [46,55,56,53].

Ген eNOS локализован в 7 хромосоме, в его экзонах и интронах обнаружено несколько полиморфных участков, среди которых наиболее изучен полиморфный маркер в интроне 4 гена eNOS (4a/4b-полиморфизм). В популяциях европеоидов и монголоидов выявлены аллели с 4 (аллель 4a) и 5 (аллель 4b) повторами [11,21]. В европейской белой национальности более распространен аллель 4b [12].

Результаты целого ряда исследований свидетельствуют о потенциальной значимости полиморфного маркера 4a/4b гена eNOS в развитии сосудистой патологии (артериальной гипертонии, атеросклероза, ИБС, ИМ и ДН) [21,13,28,29].

Результаты ассоциативных исследований свидетельствуют о том, что аллель 4a является независимым фактором риска возникновения ИМ в

японской выборке [52,69] и развития ишемического инсульта в китайской выборке [47]. В европейской выборке аллель 4b гена eNOS встречается значительно чаще, чем аллель 4a.

В исследованиях у жителей Москвы была обнаружена ассоциация 4a/4b полиморфизма гена eNOS с развитием ИМ у больных с осложнённым СД 2 типа, при этом маркерами риска являлись аллель 4a и генотипы, его содержащие [6]. В работе Д.А. Чистякова с соавторами показано достоверное увеличение частоты встречаемости аллеля 4a и генотипов 4a/4a и 4a/4b у пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми лицами [23].

Однако, другие авторы не нашли ассоциации между 4a/4b полиморфизмом и риском сердечно-сосудистых заболеваний [34,59,42].

Мета-анализ оценки связи между аллелями 4a и 4b гена eNOS проведенные в подгруппах по признаку этнической принадлежности дал основание предположить, что 4a/4b полиморфизм в гене eNOS ассоциируется с восприимчивостью к ДН в азиатских, но не в кавказоидных популяциях [48

Каримовой И.А. [8] исследован 4a/4b-полиморфизм гена eNOS у больных с эссенциальной гипертонией мужчин-узбеков. Показано значительное накопление аллеля 4b и 4b/4b-генотипа 4a/4b-полиморфного маркера гена eNOS у больных с эссенциальной гипертонией и у здоровых мужчин-узбеков. Отмечено высокое «накопление» артериальной гипертонии в семьях мужчин страдающих эссенциальной гипертонией, более выраженное при носительстве 4a-аллеля и 4a/4b- генотипа гена eNOS.

Подтверждена ассоциация гена эндотелиальной NO синтетазы с развитием ожирения у детей и подростков узбекской национальности [19].

Представляет интерес выявление взаимосвязи гена eNOS с возможным риском развития СД 2 типа в узбекской национальности и как предиктора развития и прогрессирования ИБС и его факторов риска, предрасположенности к развитию конечных стадий ДН и ДР у больных с СД 2 типа.

Представляет интерес изучение и выявление взаимосвязи полиморфизма гена eNOS как предиктора развития и прогрессирования ИБС, ИМ, предрасположенности к развитию конечных стадий ДН и ДР у больных с СД 2 типа и определение генетической детерминированности их факторов риска в узбекской национальности.

Полиморфизм гена eNOS при СД 2 типа и при его макро- и микрососудистых осложнениях в узбекской национальности ранее не изучался.

Таким образом, актуальными и неизученными аспектами являются молекулярно-генетические особенности СД 2 типа и их сосудистых осложнений в узбекской национальности, а также вопросы эффективного и безопасного лечения и ранней профилактики диабетической нефропатии при СД 2 типа.

Все это послужило основанием для проведения настоящей работы.

Выводы к главе I

С увеличением продолжительности жизни больных диабетом ДН становится все более актуальной проблемой в ряду поздних осложнений заболевания, вызывающих раннюю инвалидизацию и смертность. По потребности в лечении гемодиализом и трансплантации почек больные диабетом прочно удерживают лидерство в развитых странах. Мало изученными вопросами диабетологии остаются поражение почек у больных СД 2 типа и факторы, определяющие темпы прогрессирования данного осложнения. Это тем более тревожно, что распространенность почечной недостаточности нарастает особенно очевидно за счет больных СД 2 типа. По данным Национального регистра по СД, проведенного в Узбекистане в 2007 году[4], причиной смерти у больных с СД был ИМ в 6,0%, ХПН в 10,8%, а слепота зарегистрирована у 1,7%, т.е. конечные стадии микро- и макроангиопатий, которые приводят к выраженной инвалидизации и смертности развиваются только у 2-22% больных СД 2 типа.

По данным Каюмовой ИБС уже в 42% случаев обнаруживается сразу при первом выявлении СД 2 типа, а ДР 15,1% и ДН 4,2% [9]

Риск развития нефропатии определенно детерминирован генетическими факторами. Только приблизительно у 40-50% пациентов как с СД 1 типа, так и СД 2 типа в последующем развивается ДН. Генетические факторы могут непосредственно влиять на развитие ДН и/или действовать совместно с генами, влияющими на сердечно-сосудистые заболевания.

Поиск генетических маркеров предрасположенности или, напротив, устойчивости к заболеваниям – одна из наиболее актуальных задач медицинской науки. Это определяется тем, что установление таких маркеров открывает возможность клиницистам формировать группы риска развития заболеваний, а при некоторых патологиях устанавливать индивидуальный прогноз или диагноз (в том числе до клинической манифестации заболеваний). Оценка роли того или иного генетического маркера при СД зависит от расово-этнических вариаций частот встречаемости аллелей и

генотипов в исследованных популяциях [30,68]. В последние годы в литературе широко обсуждается генетический риск развития СД и его осложнений в зависимости от генов инсулинорезистентности, генов определяющих пониженный уровень инсулина, полиморфизма гена ангиотензин-1-превращающего фермента (АСЕ), гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) у пациентов с обоими типами сахарного диабета [14,16].

Мета-анализ оценки связи между аллелями 4a и 4b гена eNOS проведенные в подгруппах по признаку этнической принадлежности дал основание предположить, что 4a/4b полиморфизм в гене eNOS ассоциируется с восприимчивостью к ДН в азиатских, но не в кавказоидных популяциях [48]. Представляет интерес выявление взаимосвязи гена eNOS с возможным риском развития СД 2 типа в узбекской национальности и как предиктора развития и прогрессирования ИБС и его факторов риска, предрасположенности к развитию конечных стадий ДН и ДР у больных с СД 2 типа.

Представляет интерес изучение и выявление взаимосвязи полиморфизма гена eNOS как предиктора развития и прогрессирования ИБС, ИМ, предрасположенности к развитию конечных стадий ДН и ДР у больных с СД 2 типа и определение генетической детерминированности их факторов риска в узбекской национальности.

Полиморфизм гена eNOS при СД 2 типа и при его макро- и микрососудистых осложнениях в узбекской национальности ранее не изучался.

Таким образом, актуальными и неизученными аспектами являются молекулярно-генетические особенности СД 2 типа и их сосудистых осложнений в узбекской национальности, а также вопросы эффективного и безопасного лечения и ранней профилактики диабетической нефропатии при СД 2 типа.

Все это послужило основанием для проведения настоящей работы.

ГЛАВА II

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Нами было обследовано 109 мужчин, из которых 61 явились больными СД2 и 48 практически здоровых мужчин узбекской национальности. Больные СД 2 типа в возрасте 45 - 75 лет узбекской национальности и формировалась из числа больных клиники РСНПМЦЭ и Ташкентского городского эндокринологического диспансера, контрольные из практически здоровых мужчин узбекской национальности проживающих в г. Ташкенте. Принадлежность к узбекской национальности определялось, если родители и бабушка с дедушкой имели соответствующую национальность.

Диагноз СД и осложнений подтверждался клинико-лабораторными методами исследования и консультациями узких специалистов, согласно классификации ВОЗ [Дедов и др., 2000].

Диагноз СД ставился согласно классификации ВОЗ (1999г).

Критериями включения в исследование больных диабетом явились: сахарный диабет 2 типа, мужской пол, возраст старше 45 лет, узбекская национальность,

Критериями не включения в исследование больных диабетом явились сахарный диабет 1 типа, женский пол, возраст младше 45 лет, неузбекская национальность.

Критериями включения в исследование практически здоровых явились мужской пол, узбекская национальность, возраст старше 45 лет, без ожирения ($ИМТ < 30 \text{ кг/м}^2$), без артериальной гипертонии ($АД < 140/90 \text{ мм рт.ст.}$), без ИБС (без стенокардии и ИМ), без серьёзных патологий сетчатки глаза, без острых заболеваний.

Критериями не включения в исследование практически здоровых явились: женский пол, неузбекская национальность, возраст младше 45 лет, с наличием ожирения, с ИБС, с АГ, с поражением сетчатки глаз, с острыми заболеваниями, с наличием первой степени родства с больными СД 2 типа.

2.2. Методы исследования

Всем больным проводилось стандартное комплексное клинико-лабораторное обследование, включающее в себя сбор анамнеза, физикальный осмотр больного, лабораторно-инструментальные исследования. Общеклинические методы исследования включали:

а) анкетирование по разработанному протоколу исследования (см. подглаву 3.1., протокол 1 и протокол 2);

б) антропометрический метод оценки физического развития включал измерение массы тела, объема талии (ОТ) и бедер (ОБ), расчет ОТ/ОБ, индекса массы тела (ИМТ);

в) функциональные методы исследования (ЭКГ, доплерография плечевой артерии с РГ, доплерография сонной артерии с определением КИМ);

г) биохимические исследования (холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП, фибриноген, гематокрит, ФАК, ПТИ)

д) генетические исследования: определение генотипов гена eNOS.

д) консультация окулиста с прямой офтальмоскопией глазного дна;

Клинические методы исследования

Клиническое обследование проводилось в РСНПМЦ Эндокринологии МЗ РУз. Клиническое состояние больных - физикальное обследование (рост, вес, ИМТ, ОТ, ОБ, АД, ЧСС).

Рост - измерение роста производится при помощи ростомера. Обследуемый стоит спиной к измерительной линейке ростомера, касаясь ее межлопаточной областью, ягодицами, пятками. Голову держит прямо так, чтобы линия, соединяющая наружный угол глаза и козелок уха были на одной горизонтальной линии. Планку ростомера опускают до соприкосновения с верхушечной точкой головы. Результаты измерений заносятся в "Протокол исследования" в сантиметрах (без долей).

Вес - измеряется в легкой одежде и без обуви. Результаты измерений заносятся в "Протокол исследования" в килограммах (с округлением до целого).

ИМТ (индекс массы тела) рассчитывается по формуле:

ИМТ (в кг/м²) = вес, деленный на рост в квадрате: Вес(кг)/Рост(м²)

Обхват талии- измеряется по самому узкому месту талии на уровне пупка.

Обхват бедер - измеряется по наиболее выступающим точкам ягодиц. В зависимости от роста мерка снимается на расстоянии 18-22см от линии талии

Измерение АД проводили по стандартной методике (метод Короткова механический). Для измерения давления предусмотрен очень простой прибор, состоящий из механического манометра, манжеты с грушей и фонендоскопа. Метод основан на полном пережатии манжетой плечевой артерии и выслушивании тонов, возникающих при медленном выпуске воздуха из манжеты. Уровень АД оценивали на основании современной классификации АД в зависимости от уровня АД (ВНОК, 2001).

Биохимические методы исследования.

Содержание глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом в капиллярной крови натощак и через 2 часа после теста на толерантность к глюкозе (ТТГ) с помощью наборов фирмы «CypressDiagnostics» (Бельгия).

Согласно критериям ВОЗ (2003г.)[28]

Нормальная гликемия натощак = менее 5,6 ммоль/л

Нарушенная гликемия натощак $\geq 5,6$ ммоль/л $\leq 6,9$ ммоль/л;

Сахарный диабет при гликемии натощак более 7,0 ммоль/л;

Нормальная толерантность к глюкозе – менее 7,8 ммоль/л через 2 часа после нагрузки глюкозой.

Нарушенная толерантность к глюкозе- от 7,8 до 11,1 ммоль/л через 2 часа после нагрузки глюкозой.

Сахарный диабет – более 11,1 ммоль/л через 2 часа после нагрузки глюкозой.

Гликированный гемоглобин (HbA1c) определялся колориметрическим тиобарбитуровым методом.

1. Забор крови.

0,3 мл цитрата в мерную центрифужную пробирку + 3 мл крови из вены.

Центрифугировать 15 минут на 1500 обор/мин.

2. Отмывание эритроцитов.

Отсосать плазму пипеткой, слить в стакан. В пробирку с эритроцитами добавить физ. раствор до объема 10 мл.

Перемешать стеклянной палочкой и центрифугировать 10 минут на 1500 обор/мин. Затем отсосать прозрачную жидкость в стакан и снова добавить физ. раствор до 10 мл. Всё это повторить 3 раза.

В большую пробирку налить 4,5 мл бидистиллированной воды + 0,5 мл взвеси эритроцитов.

Все хорошо перемешать для получения гемолизата.

3. Гидролиз.

В центрифужную пробирку влить 2 мл гидролизата + 1 мл щавелевой кислоты (0,3 N), перемешать палочкой, закрыть пробкой и поставить кипятить в водяную баню на 1 час.

После того, как остынет, добавить 1мл ТХУК 40%. Выпадет осадок. Все хорошо перемешать стеклянной палочкой и центрифугировать 10 минут на 3000 обор/мин, затем пропустить через фильтровальную бумагу в большую пробирку – получили элюат.

4. 2 мл элюата + 0,5 мл 0,05 М ТБК, поставить в термостат на 40 минут при 40°C.

Затем смотреть содержимое на спектрофотометре на длине волны 443 нм против бидистиллированной воды.

Спектрофотометр включить за 40 минут.

ТБК 0,05М = 18 мг ТБК + 2,5 мл H₂O

0,3N р-р щавелевой кислоты: 7,56г щавелевой кислоты до 200 мл H₂O

40% ТХУК: 40г ТХУК до 100 мл H₂O

Цитрат: 3,7г до 100 мл H₂O

Норма: 4,5-6,7%

Липидный спектр крови определяли с помощью наборов фирмы «CypressDiagnostics» (Бельгия) на спектрофотометре «HospitexDiagnostics» (Италия). ОХС и ТГ в сыворотке крови определяли стандартным ферментативным способом, ХС ЛПВП в супернатанте – после преципитации липопротеинов других классов декстрансульфатом. Показатели ХС ЛПНП рассчитывали по формуле W.Friedwald (1972): $ХС\ ЛПНП = ОХС - (ТГ/2,2 + ХС\ ЛПВП)$, моль/л.

Содержание аполиппротеинов AI, B определяли на биохимическом автоанализаторе «Daytona» (RANDOX, Великобритания), с помощью метода иммунотурбидиметрии, с использованием моноспецифических антител к человеческому апо-В. Рассчитывали соотношение апо-В/апо-АI. Значение коэффициента считали нормальным при величине соотношения <1,0.

Общий анализ мочи и анализ мочи по Нечипоренко. Мочу для исследования берут утром, сразу после сна больного. Пациент должен быть подробно проинструктирован о порядке сбора мочи. Посуду для сбора мочи необходимо предварительно вымыть и высушить. На нее наклеить этикетку с указанием фамилии и инициалов, возраста пациента, номера медицинской карты, даты, номера палаты и отделения, а также вида исследования. Медицинская сестра должна обучить больного тщательной обработке наружных половых органов водой с мылом. Для общего клинического анализа пациент должен собрать 100-200 мл свежесобранной мочи. Для исследования по методу Нечипоренко необходимо собрать 2-3 мл мочи из средней утренней порции. Наряду с количественным определением эритроцитов, лейкоцитов, цилиндров, белка мочи, метод позволяет дифференцировать происхождение лейкоцитурии (с наружных половых органов или из мочевыводящих путей).

Функциональные методы исследования

Электрокардиографическое исследование: ЭКГ в 12 стандартных отведениях (Cardiofax, Германия).

Генетические методы исследования.

Генотипирование проводится в ГП «Учебно-экспериментальный Центр высоких технологий».

Этапы генетических исследований:

1. Выделение ДНК
2. ПЦР амплификация
3. Электрофорез

Все этапы одинаковы для трех генов, кроме того, что для амплификации каждого гена используются специфические праймеры.

В работе использовано нижеперечисленное оборудование:

1. GeneAmp® ПЦР – Real Time PCR 7500
2. Высокоскоростная центрифуга для микропробирок
3. Микропробирки объемом 1,5 мл
4. Микропипетки "Varipipette" переменного объема на 1000, 200 и 20 мкл
и наконечники к ним
5. Штатив для пробирок 2,0 мл
6. Термостат типа блок "Термит"
7. Встряхиватель типа «Vortex»
8. Весы электронные «DENVER INSTRUMENT» 200 G
9. Камера для горизонтального электрофореза "SE-2" Helicon
10. Система документирования результатов геля электрофореза - WiseDOC, модель-WGD-30GeldocumentationsystemWiseDOCmodelWGD-30
11. Микроволновая печь, M1712NR Samsung
12. Источник питания "Эльф-8"
13. Шпатели

Выделение ДНК

Материалом для ДНК служила венозная кровь из локтевой вены объемом 1 мл. Для сбора, хранения и транспортировки крови использовались

вак्यूтейнеры или одноразовые пластиковые пробирки с антикоагулянтом (консерватором) объемом 0,5 мл. Кровь для дальнейшей обработки хранилась при температуре не менее +4 °С.

Выделение ДНК из цельной крови осуществлялось набором реагентов Diatom™ DNAPrep 200 (производство ООО “Лаборатория ИзоГен”, Москва, Россия). Данный набор реагентов основан на использовании лизирующего реагента с гуанидинтиоцианатом, который предназначен для лизиса клеток, солюбилизации клеточного дербиса, а также для денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии лизирующего реагента ДНК активно сорбируется на NucleoS™ - сорбенте. ДНК, элюированная из сорбента ЭкстаГеном Е™ или чистой водой напрямую использовалась для дальнейшего проведения анализа. Выделение ДНК проводилось по стандартному протоколу выделения ДНК с использованием набора реагентов Diatom™ DNAPrep 200.

Протокол выделения ДНК с использованием сухого набора реагентов Diatom™ DNA Prep 200

Характеристика набора

ДНК, выделенная из свежего биологического материала (цельной крови, клеточной культуры, гомогената ткани и т.д.), является высокомолекулярной, 40-50 тыс.н.п...

Набор реагентов обеспечивает высокую чистоту выделенной ДНК OD 2601280 нм 1,6-2,0.

Выход чистой ДНК из цельной крови составляет 5-10 мкг из 200 мкл крови.

Протокол выделения ДНК

Приготовление рабочего раствора Солевого буфера. Содержимое флакона с 10-кратным Солевым буфером, 10мл, перенести в мерный цилиндр, довести бидистиллированной водой до метки 100 мл и 96% этиловым спиртом до метки 300 мл и перемешать. Готовый рабочий раствор Солевого буфера следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре 4° С.

В пробирку объемом 1,5 мл внести 200 мкл исследуемой пробы, добавить 800 мкл Лизирующего реагента и перемешать содержимое пробирки переворачиванием (5-10 раз). Интенсивное встряхивание смеси не рекомендуется.

Термостатировать пробирку со смесью 5-7 мин. при температуре 65°C. Если выделение ДНК проводится из твердого сухого мелкоизмельченного материала, то следует термостатировать 30-40 мин.

После термостатирования центрифугировать пробирку со смесью 10 сек при 5000 об/мин в том случае, если смесь содержит несолюбилизированный клеточный дебрис или другой нерастворенный осадок. Прозрачный супернатант целиком перенести в чистую пробирку.

В пробирку с чистой смесью добавить 20-40 мкл суспензии сорбента NucleoS™ (40 мкл если выделение ДНК проводится из цельной крови или другой богатой ДНК жидкости). Перед использованием NucleoS™ следует интенсивно перемешать до гомогенной суспензии на вортексе.

Пробирку поместить на ротатор и перемешивать 10 мин (10-20 об/мин)

Центрифугировать 10 сек при 5000 об в мин.

Осторожно, не задевая осадок, удалить супернатант с помощью водоструйного насоса.

К осадку добавить 400 мкл Лизирующего реагента, тщательно перемешать на вортексе до полного гомогенного состояния.

Добавить в пробирку 1 мл рабочего раствора Солевого буфера

Перемешать содержимое пробирки переворачиванием пробирки 5-10 раз

Центрифугировать 10 сек при 5000 об. в мин.

Осторожно удалить супернатант, не задевая осадок, с помощью водоструйного насоса.

Добавить в пробирку 1 мл Солевого буфера, перемешать содержимое пробирки на вортексе, центрифугировать 10 сек при 5000 об. в мин., осторожно удалить супернатант, не задевая осадок, с помощью насоса.

Повторить положение 14.

Посушить осадок при температуре 65°C в течение 3-4 мин.

В эту же пробирку внести 100-200 мкл ЭкстраГена Е™. *Внимание! Экстра Ген Е™ следует отбирать от общего объема при постоянном перемешивании!

Суспендировать содержимое пробирки на вортексе 5-10 сек до получения гомогенной суспензии, затем термостатировать 4-5 мин при 65°C.

Еще раз суспендировать содержимое пробирки на вортексе перед центрифугированием.

Центрифугировать 1 мин при 10000 об. в мин.

Перенести супернатант с ДНК в чистую пробирку. ДНК хранить при температуре -20°C.

Определение полиморфизма эндотелиальной NO синтазы (eNOS) - проведение ПЦР – амплификации

ПЦР анализ проводили с использованием набора реагентов для ПЦР амплификации ДНК (производство ООО «Центр Молекулярной Генетики», Москва, Россия).

Набор предназначен для выявления полиморфного маркера гена eNOS основаны на определении наличия/отсутствия фрагмента длиной 287 пар нуклеотидов (п.н.) в исследуемом ДНК-фрагменте в крови пациента методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Протокол проведения ПЦР-реакции с использованием сухого набора реагентов GenePak™ PCR Core

1. Перед проведением реакции вынуть из холодильника нужное количество пробирок МастерМикса;
2. Промаркировать соответствующим образом необходимое количество пробирок Мастер-Микса: (+), (-) контроли и исследуемые пробы;
3. Добавить во все пробирки по 5 мкл смеси праймеров. Рекомендуемая конечная концентрация праймеров 0.1-0.5 мкМ;

4. Добавить во все пробирки, включая и контроли, по 10 мкл ПЦР растворителя. Специально растворять содержимое пробирки не обязательно;

5. Добавить в соответствующие пробирки Мастер Микса по 5 мкл исследуемой ДНК. В качестве (-) контроля следует использовать бидистилл. воду или тот растворитель, в котором растворена исследуемая ДНК. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 20 мкл) масла. *Внимание! Для предотвращения контаминации при работе с исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется использовать специальные наконечники с антиаэрозольными фильтрами.

6. Перенести пробирки в термоблок программируемого термостата и запустить соответствующую программу амплификации. При выборе программы амплификации рекомендуется использовать температуру отжига на 2-3°C ниже оптимизированной для данной пары праймеров на стандартном PCR буфере без денатурирующих агентов (глицерина, ДМСО, формамида и т.д.);

7. После окончания амплификации все пробирки перенести в комнату для проведения электрофореза (детекции) ДНК. 5-10 мкл ПЦР продукта использовать для анализа гель-электрофорезом без дополнительного разбавления краской для нанесения.

Программа амплификации: 1 этап (1 цикл): Денатурация. t=2 мин, T=94 оС. 2 этап (30 циклов): Денатурация. t=20 сек, T=91 оС. Отжиг. t=15 сек, T=68 оС. Элонгация. t=20 сек, T=72 оС. 3 этап (1 цикл): Охлаждение реакционной смеси. t=5 мин, T=4 оС. Для верификации продуктов амплификации используют метод электрофореза.

После проведения стандартной ПЦР-амплификации гена eNOS полученные ПЦР продукты подвергались ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (рестрикции) с использованием эндонуклеазы рестрикции RsaI(фермент) (производство НПО “Сибэнзим”).

В стерильные, пустые пробирки объемом 0,2 мл, добавили по 4 мкл ПЦР продукта, по 13,75 мкл воды, по 2 мкл рестрикционного буфера, по 0,25 мкл фермента RsaI, с конечной концентрацией 20 ед/мкл.

Затем полученная рестрикционная смесь помещалась в термостат на 16 часов при 37°C.

Визуализация и фотодокументация результатов ПЦР – амплификации (электрофорез)

ПЦР-продукты амплификации фракционировали в 3 % агарозном геле (в течение 60-90 мин при напряжении 120 В, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете.

Метод обработки данных

Результаты исследований обрабатывались методом вариационной статистики. Статистическую обработку фактического материала и графические изображения проводили на ЭВМ с использованием программных средств MS Excel 2010. Достоверность данных оценивали с помощью критерия достоверности Стьюдента (t).

Выводы к главе II

В проведенной научной работе было обследовано 109 мужчин, из них 61 больной СД2 и 48 практически здоровых мужчин узбекской национальности. Больные СД 2 типа в возрасте 45 - 75 лет узбекской национальности и формировалась из числа больных клиники РСНПМЦЭ и Ташкентского городского эндокринологического диспансера, контрольные из практически здоровых мужчин узбекской национальности проживающих в г. Ташкенте.

Всем больным проводилось стандартное комплексное клинико-лабораторное обследование, включающее в себя:

а) анкетирование по разработанному протоколу исследования (см. подглаву 3.1., протокол 1 и протокол 2);

б) антропометрический метод оценки физического развития включал измерение массы тела, объема талии (ОТ) и бедер (ОБ), расчет ОТ/ОБ, индекса массы тела (ИМТ);

в) функциональные методы исследования (ЭКГ, доплерография плечевой артерии с РГ, доплерография сонной артерии с определением КИМ);

г) биохимические исследования (холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП, фибриноген, гематокрит, ФАК, ПТИ)

д) генетические исследования: определение генотипов гена eNOS.

д) консультация окулиста с прямой офтальмоскопией глазного дна;

Генотипирование проводится в ГП «Учебно-экспериментальный Центр высоких технологий».

Результаты исследований обрабатывались методом вариационной статистики. Статистическую обработку фактического материала и графические изображения проводили на ЭВМ с использованием программных средств MS Excel2010. Достоверность данных оценивали с помощью критерия достоверности Стьюдента (t).

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проведено изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера гена eNOS у 109 мужчин, из которых 61 явились больными СД2 и 48 практически здоровых мужчин узбекской национальности во взаимосвязи с анамнестическими, антропометрическими, гемодинамическими, биохимическими и функциональными показателями и оценка роли полиморфизма гена eNOS в риске развития диабетической нефропатии при СД 2 типа узбекской национальности.

3.1. Разработка протоколов исследования по изучению распределения генотипа генов eNOS при СД2 и у практически здоровых мужчин узбекской национальности.

Разработаны два протокола исследования. «Протокол 1» создан для изучения распределения генотипов гена eNOS у мужчин больных СД2 и «Протокол 2» для изучения генотипов гена eNOS у практически здоровых мужчин узбекской национальности. Протокол исследования включает обширную информацию необходимого для решения поставленных задач данного проекта исследования. Протокол исследования составлен так, чтобы была удобна компьютерная обработка материала. Разработанные протоколы исследования по изучению распределения генотипов гена eNOS при СД2 (протокол 1) и у практически здоровых мужчин узбекской национальности (протокол 2) даны в приложении.

Критериями включения в исследование больных диабетом явились: сахарный диабет 2 типа, мужской пол, возраст старше 45 лет, узбекская национальность,

Критериями не включения в исследование больных диабетом явились сахарный диабет 1 типа, женский пол, возраст младше 45 лет, неузбекская национальность.

Критериями включения в исследование практически здоровых явились мужской пол, узбекская национальность, возраст старше 45 лет, без ожирения (ИМТ<30кг/м²), без артериальной гипертонии (АД<140/90 мм рт.ст.), без ИБС (без стенокардии и ИМ), без серьезных патологий сетчатки глаза, без острых заболеваний.

Критериями не включения в исследование практически здоровых явились: женский пол, неузбекская национальность, возраст младше 45 лет, с наличием ожирения, с ИБС, с АГ, с поражением сетчатки глаз, с острыми заболеваниями, с наличием первой степени родства с больными СД 2 типа.

3.2. Данные по осложнениям СД у обследованных больных.

Таблица 1

Микроангиопатия у больных сахарным диабетом 2 типа

Осложнения	Количество	Общее количество
Непролиферативная ретинопатия (ДР 1)	9 (14,8%)	17 (27,8%)
Препролиферативная ретинопатия (ДР 2)	7 (11,5%)	
Пролиферативная ретинопатия (ДР 3)	1 (1,6%)	
Нефропатия III	33 (54,1%)	45 (73,7%)
Нефропатия IV – V	12 (19,7%)	
ХПН I	3 (4,9%)	
Диабетическая энцефалопатия 1	3 (4,9%)	13 (21,3%)
Диабетическая энцефалопатия 2	9 (14,8%)	
Диабетическая энцефалопатия 3	1 (1,6%)	
Сенсорная полинейропатия	38 (62,3%)	38 (62,3%)

Как видно из таблицы 1, у 17 (27,8%) обследованных больных установлена ретинопатия различной степени у 45 (73,7%) нефропатия, при этом нефропатия на доклинической стадии составила 33 (54,1%) больных, клиническая стадия составила 12 (19,7%) больных, диабетическая энцефалопатия составила 13 (21,3%) больных, сенсорная полинейропатия выявлена у 38 (62,3%) больных.

На следующей таблице № 2 приведены данные макроангиопатии у больных сахарным диабетом 2-типа узбекской национальности.

Таблица 2

Макроангиопатия у больных сахарным диабетом 2 типа

Осложнения		Количество	Общее количество
Синдром диабетической стопы		1 (1,6%)	1 (1,6%)
ИБС стенокардия напряжения	ФК II	14 (23,0%)	21 (34,4%)
	ФК III	3 (4,9%)	
	ФК IV	6 (9,8%)	
Инфаркт миокарда	Первично	6 (9,8%)	8 (13,1%)
	Повторно	2 (3,3%)	
Хроническая сердечная недостаточность	ФК I	3 (4,9%)	6 (9,83%)
	ФК II	9 (14,8%)	
	ФК III	1 (1,6%)	
Инсульт		1 (1,6%)	1 (1,6%)

Как видно из таблицы синдром диабетической стопы выявлен у 1 (1,6%) больного, ИБС различного функционального класса у 21 (34,4%), инфаркт миокарда у 8 (13,1%), хроническая сердечная недостаточность различного функционального класса у 6 (9,83%), всего у 1 (1,6%) больного был инсульт в анамнезе.

Контрольную группу составили 48 практически здоровых людей без сахарного диабета и сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний соответствующего возраста пола и национальности.

3.3. Изучение распределения больных разных генотипов по возрастным группам и по стажу заболевания.

В соответствии с поставленной задачей нами проведена изучении взаимосвязи факторов риска развития и прогрессирования диабетической нефропатии при сахарном диабете 2-типа в ассоциации полиморфизма генотипов 4a4b и 4b4b гена eNOS и распределены по возрастным категориям и по стажу заболевания, данные представлены в таблице 3,4.

Таблица 3

Распределение больных разных генотипов по возрастным группам и встречаемость в них диабетической нефропатии.

Возраст больных	общ кол больных	4а4в	ДН	4в4в	ДН	общ кол ДН
до 50 лет	22 (36,1%)	3 (37,5%)	1 (33,3%)	19 (35,8%)	1 (5,3%)	4 (6,6%)
51-60 лет	28 (45,9%)	3 (37,5%)	2 (66,6%)	25 (47,2%)	4 (16,0%)	2 (3,3%)
61-70 лет	11 (18,0)	2 (25,0%)	2 (100%)	9 (17,0%)	2 (22,2%)	6 (9,8%)
общее	61	8 (13,1%)	5 (62,5%)	53 (86,9%)	7 (13,2%)	12 (19,7%)

Таблица 4

Распределение больных разных генотипов по стажу заболевания и встречаемость в них диабетической нефропатии.

Длительность СД	общ кол больных	4а4в	ДН	4в4в	ДН	общ кол ДН
1-5 лет	33 (54,1%)	2 (25,0%)	0	31 (58,5%)	2 (6,4%)	2 (3,3%)
6-10 лет	12 (19,7%)	2 (25,0%)	2 (100%)	10 (18,9%)	1 (10,0%)	3 (4,9%)
11-15 лет	7 (11,5%)	3 (37,5%)	2 (66,6%)	4 (7,5%)	1 (25,0%)	3 (4,9%)
16-20 лет	5 (8,2%)	0	0	5 (9,4%)	2 (40,0%)	2 (3,3%)
более 20 лет	4 (6,6%)	1 (12,5%)	1 (100%)	3 (5,6%)	1 (33,3%)	2 (3,3%)
общее	61	8 (13,1%)	5 (62,5%)	53 (86,9%)	7 (13,2%)	12 (19,7%)

Генотип 4а4б гена eNOS обуславливает восприимчивость к диабетической нефропатии в азиатской популяции. В таблице представлены данные по распределению больных разных генотипов по возрастным группам и по стажу заболевания а как же встречаемость в них диабетической нефропатии.

Как видно из таблиц 3 и 4, среди 61 больных сахарным диабетом 2-типа у 8 (13,1%) больных выявлен генотип 4а4б, диабетическая нефропатия выявлена у 5 (62,5%) из них, у преимущественно большинства. У 53 (86,9%) больных сахарным диабетом 2-типа выявили протективный генотип 4б4б, и именно в этой группе диабетическая нефропатия развилась в несколько раз меньше, то есть у 7 (13,21%) больных.

Полученные данные свидетельствуют что развитие нефропатии может быть генетически детерминировано имени генотипом 4а4б.

Значимость полученных данных свидетельствует о необходимости этих исследований при сахарном диабете 2-типа у мужчин узбекской национальности. Наличие такого генотипа позволяет отнести их обладателей в группу риска развития диабетической нефропатии. На основании чего именно у них должны быть проведены профилактические меры предупреждения диабетической нефропатии, который заключается в нормализации в первую очередь гликемии, строгого контроля артериального давления, даже при отсутствии повышения артериального давления назначать ингибиторы АПФ, наладить определение микроальбуминурии для ранней диагностики, по результатам определение липидного спектра - назначать гиполипидемические препараты, при наличии воспалительных процессов в мочевыделительном тракте - тщательное их лечение.

3.4. Изучение распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера eNOS во взаимосвязи с анамнестическими, антропометрическими, гемодинамическими, биохимическими и функциональными показателями.

Полиморфизм гена eNOS у больных СД2 и практически здоровых мужчин узбекской национальности

Мужчинам узбекской национальности больным СД2 (n=61) с продолжительностью заболевания $5,9 \pm 0,75$ лет и в возрасте $49,9 \pm 1,1$ лет (рис 1) проведено генетическое исследование на распределение 4a, 4b аллелей (рис 3 и 4) и 4a4a, 4a4b, 4b4b генотипов (рис 5) гена eNOS. При анализе распределения частоты генотипов 4a4b полиморфного маркера гена eNOS было выявлено, что у больных СД2 по генотипам распределение было следующим: 4a4b генотип был верифицирован у 8 (13,2%), 4b4b генотип у 53 (86,8%) больных, 4a4a генотип, который способствует развитию патологий вообще не выявлялся. При этом 4a аллель был выявлен в 8 (6,7%) случаях, 4b аллель в 114 (93,4%) случаях (таб.5).

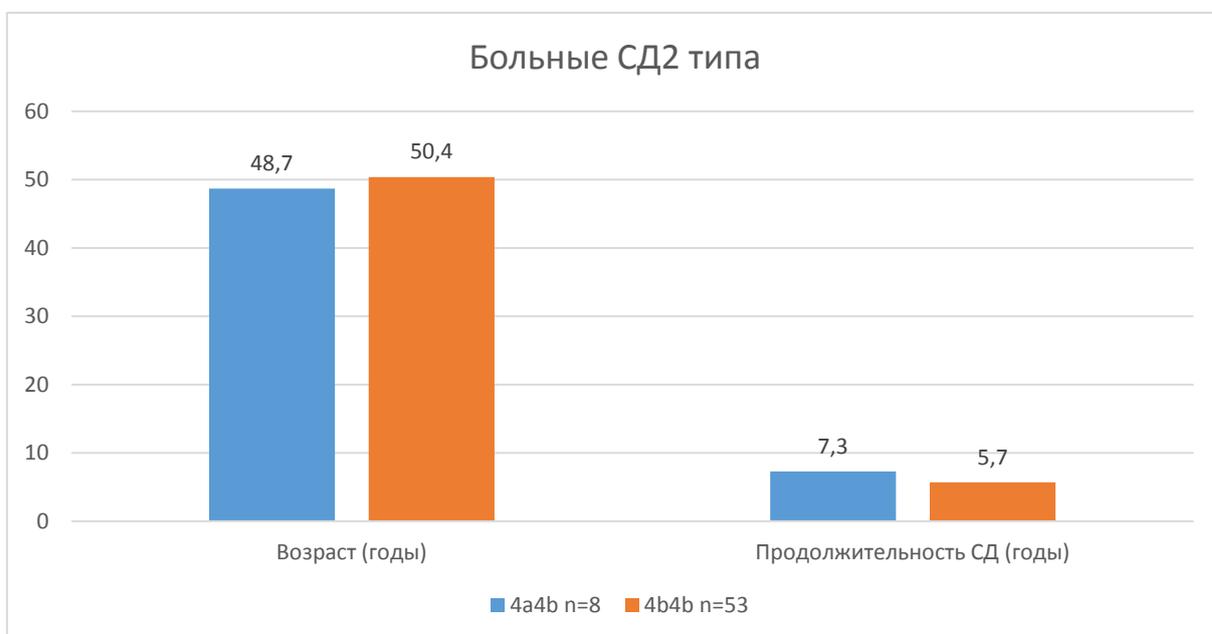


Рис.1. Возраст и стаж заболевания у больных СД2 узбекской национальности.

Результаты электрофореза ПЦР-продуктов гена eNOS у больных СД2 показаны на рис.2.



Рис.2. Электрофореограмма ПЦР-продуктов гена eNOS у больных СД2 узбекской национальности.

В группе здоровых мужчин узбекской национальности наблюдалось минимальное содержание 4a4a генотипа – 1 (2,1%) случай, 4a4b генотип выявлялся в 7 (14,6%) случаях, кроме этого, как и у больных СД2 также превалировало содержание 4b4b генотипа – 40 (83,3%) случаев (рис 5). Частота 4a аллеля составила 7,4% (7), а 4b аллеля 92,6% (87) (рис 3 и 4), (табл 5).

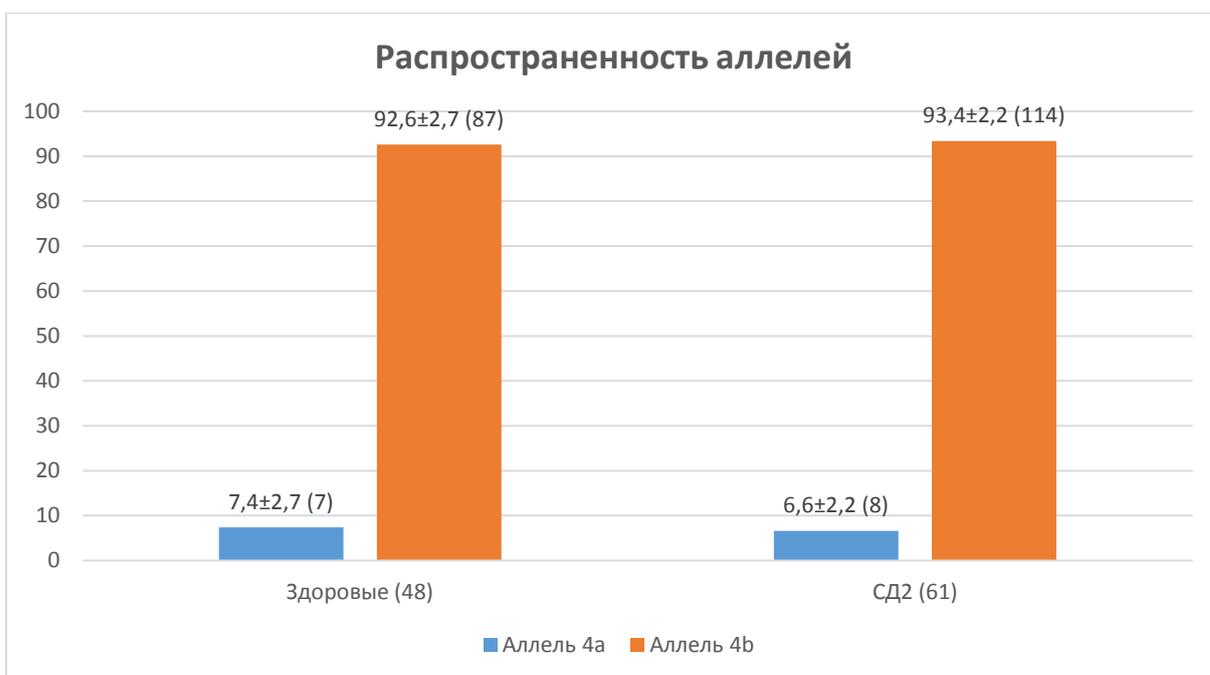


Рис.3. Распространённость аллелей у здоровых и у больных СД2 узбекской национальности.

Таблица 5

Сравнительный анализ распространенности аллелей и генотипов гена eNOS у больных СД2 и у здоровых

№	Генетический маркер	Распространенность, %		P
		Здоровые (48)	СД2 (61)	
1	Аллель 4a	7,4±2,7 (7)	6,6±2,2 (8)	>0,05
2	Аллель 4b	92,6±2,7 (87)	93,4±2,2 (114)	>0,05
3	Генотип 4a4a	2,1±2,06 (1)	-	
4	Генотип 4a4b	14,6±5,1 (7)	13,1±4,3 (8)	>0,05
5	Генотип 4b4b	83,3±5,4(40)	86,9±4,3(53)	>0,05
	P 1-2	<0,001	<0,001	
	P 3-4	>0,05		
	P 3-5	<0,001		
	P4-5	<0,001	<0,001	

Примечание: * при P <0,05, ** при P <0,01, *** при P <0,001 по отношению к группе с 4a4b

В группе здоровых и больных СД2 аллель 4b значительно превалировал над аллелем 4a ($P < 0,001$), соответственно содержание генотипа 4b4b было больше в сравнение с генотипом 4a4a ($P < 0,001$).

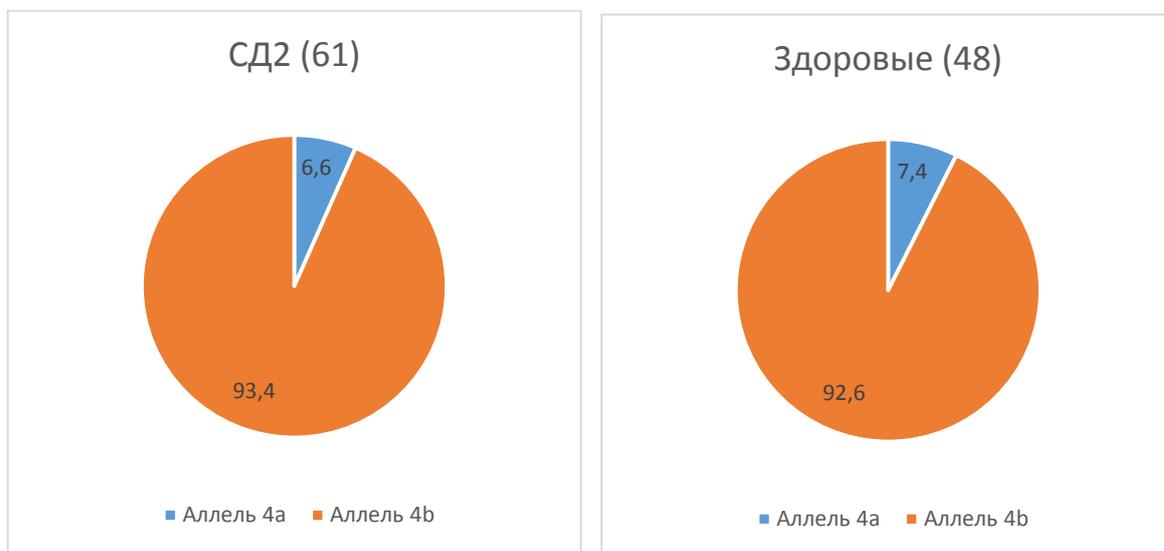


Рис.4. Распространённость аллелей у здоровых и у больных СД2 узбекской национальности.



Рис.5. Распространённость генотипов у здоровых и у больных СД2 узбекской национальности.

Таким образом, между исследованными группами здоровых мужчин и больных СД2 узбекской национальности, не по аллелям, не по представленности генотипов достоверной разницы не было, за исключением,

того, что в группе здоровых мужчин генотип 4a4a наблюдался в одном случае, а при СД2 отсутствовал.

Результаты электрофореза ПЦР-продуктов гена eNOS у здоровых мужчин показаны на рис.6.

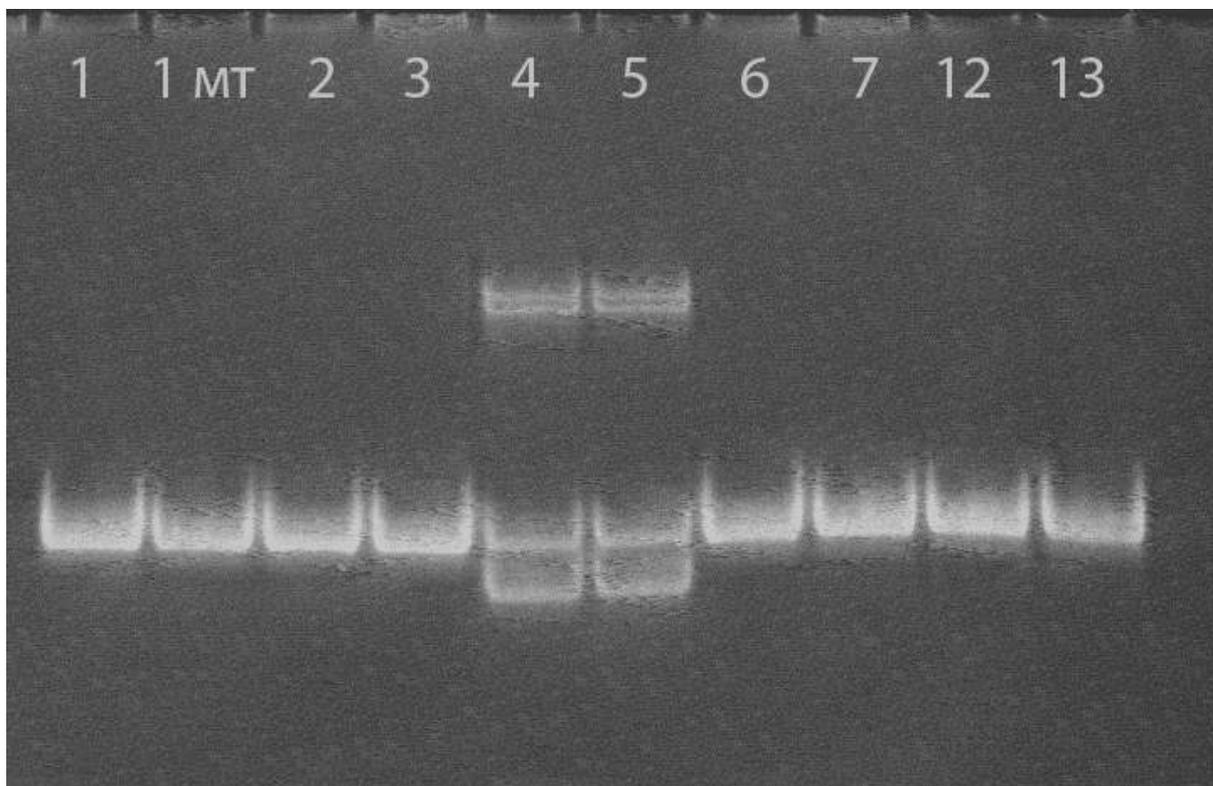


Рис.6. Электрофореограмма ПЦР-продуктов гена eNOS у здоровых мужчин узбекской национальности.

В европейской популяции аллель 4b гена eNOS встречается значительно чаще, чем аллель с 4 повторами. Распределение частот аллелей в популяции составляет соответственно 4b/4b – 0,41, 4b/4a – 0,46 и 4a/4a – 0,13. У австралийских европеоидов и японцев, гомозиготных по аллелю eNOS4a, уровень нитратов и нитритов в крови, напрямую связанный со скоростью выработки NO эндотелием сосудов, достоверно выше, чем у лиц с генотипом 4b/4b, что свидетельствует о потенциальной роли генотипа 4a/4a как фактора риска развития заболеваний, сопровождающихся нарушением нормальной выработки окиси азота [26]. Этот полиморфизм ассоциирован с повышением уровня циркулирующих нитратов и нитритов и у здоровых людей [27].

Четко прослеживается связь между уровнем продукции NO в организме и выраженностью окислительного стресса при сосудистой патологии: ингибирование синтеза и резкое снижение содержания NO в кровяном русле связано с накоплением свободных радикалов кислорода и перекисей. У гомозиготных носителей аллеля 4a гена eNOS [28] выявлено достоверно более низкое содержание внеклеточной супероксиддисмутазы (одного из ферментов антиоксидантной защиты).

Показаны достоверно более высокое содержание аллеля 4a и частота генотипа 4a/4a среди японцев, страдающих гипертензией и перенесших инфаркт миокарда [29, 30].

При анализе частот аллелей в группах больных ГБ и здоровых людей достоверных различий не обнаружено [31]. Однако при выделении группы больных с артериальной гипертензией и гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ) частота встречаемости аллеля 4a была достоверно выше, чем в группе здоровых людей [32].

eNOS среди здорового населения в различных этнических группах (1,1 % – для азиатского, 15,36 % – для неазиатского населения, $P < 0,0001$) [10]. Данные литературы относительно роли этого полиморфизма в развитии ДН противоречивы [5, 10, 11, 14, 36–38, 43, 48].

Клинико-биохимические параметры больных СД2 при различных генотипах гена eNOS

Клиническая характеристика больных СД2 при различных генотипах гена eNOS

Всем обследованным лицам определяли антропометрические данные – рост в см, вес в кг, проводили наблюдение за показателями индекса массы тела по Кетле (ИМТ), проводили сбор анамнеза, определяли жалобы, измеряли показатели гемодинамики САД, ДАД, частота сердечных сокращений.

Возраст больных в группах с наличием 4a4b, 4b4b генотипа был практически одинаковым, продолжительность СД2 была больше в группе с генотипом 4a4b, но не достигала достоверной разницы (рис 1), (таб.6).

ИМТ, ОТ/ОБ не имели достоверной разницы в группах с генотипом 4a4b и 4b4b. Относительно тяжелая степень ожирения при СД2 наблюдалась в целом больше в группе с генотипом 4b4b, чем в группе больных с генотипом 4a4b ($P>0,05$). Ожирения IIIст в группе больных с генотипом 4a4b не было.

Таблица 6

Клиническая характеристика больных СД2 при различных генотипах гена eNOS

Параметры		4a4b n=8	4b4b n=53
Возраст (годы)		48,7±3,4	50,4±1,1
Продолжительность СД (годы)		7,3±2,6	5,7±0,8
ИМТ (кг/м ²)		33,4±0,8	32,1±0,7
ОТ/ОБ		1,04±0,02	1,01±0,01
ИзМТ		-	21(39,6±6,7)
Ожирение Iст		5(62,5±17,1)	14(26,4±6,0)
Ожирение IIст		1(12,5±11,7)	8(15,1±4,9)
Ожирение IIIст		-	5(9,4±4,0)
Ожирение Iст+IIст+IIIст		6(75±15,3)	27(50,9±6,87)
Длительность ожирения (годы)		14,0±1,3	2,05±2,3***
АГ	I	4(50±17,7)	18(50,9±6,9)
	II	-	4(7,5±3,6)
	III	-	4(7,5±3,6)
АГ I+II+III		4(50±17,7)	26(49,1±6,9)
Длительность АГ(годы)		8±3,4	6,8±1,04
Наследств	по АГ	3(37,5±17,1)	20(37,7±6,6)

енность	по СД	4(50±17,7)	19(35,8±6,6)
	по ожирению	4(50±17,7)	19(35,8±6,6)
	по ИБС	3(37,5±17,1)	11(20,8±5,6)

Примечание: * при $P < 0,05$, ** при $P < 0,01$, *** при $P < 0,001$ по отношению к группе с 4a4b

При этом длительность ожирения в группе с генотипом 4a4b была больше ($14,0 \pm 1,3$), чем в группе с генотипом 4b4b ($2,05 \pm 2,3$) ($P < 0,001$).

Артериальная гипертензия (АГ) играет ключевую роль в развитии и прогрессировании ДН так же, как и в развитии макроваскулярной патологии. По мере прогрессирования ДН роль метаболических факторов снижается и возрастает роль АГ. Предупредить развитие и прогрессирование сосудистых осложнений (в том числе и ДН) возможно только при поддержании АД на уровне не более 130/80 мм рт. ст. Более жесткий контроль АД у лиц с почечной патологией может привести к гипоперфузии других органов-мишеней. При СД 1 типа генез АГ на 80-90% связан с развитием ДН. Она наблюдается у 35-40% больных СД 1 типа. АГ при СД 1 типа носит Назависимый и объемзависимый характер. В отличие от больных СД 1 типа у больных СД 2 типа АД уже повышено до развития ДН. У 80% больных СД 2 типа в момент диагностики заболевания амбулаторный контроль выявляет повышенное АД или его нарушенный циркадный профиль. Развившаяся ДН усиливает АГ следующими механизмами:

- задержка натрия;
- чрезмерная активация РААС (ренин-ангиотензин-альдостероновая система), по крайней мере локальной в почках;
- симпатическая гиперактивация;
- замедление эндотелий зависимой вазодилатации.

Эти механизмы определяют выбор антигипертензивных средств ИАПФ (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента), блокаторы рецепторов ангиотезина II (БРА), петлевые диуретики, блокаторы симпатической системы.

Биохимические показатели у больных СД2 при различных генотипах гена eNOS

Биохимические показатели в обеих группах не имели достоверной разницы (рис 7, 8, 10) кроме уровня апоВ и соотношения апоВ/апоАI, которые были выше в группе больных с 4a4b генотипом ($P<0,05$) (рис 9), что свидетельствует о более высоком риске развития атеросклероза у этих лиц по сравнению с больными имеющих 4b4b генотип гена eNOS (таб.7).

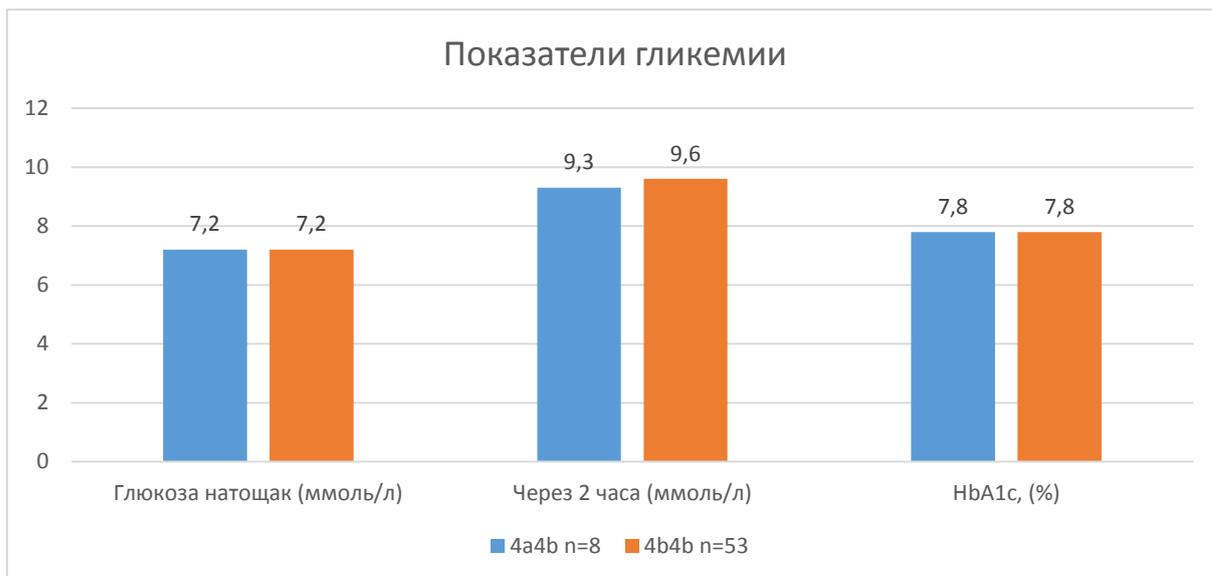


Рис.7. Показатели гликемии у больных СД2 узбекской национальности в зависимости от генотипов.

Показатели гликемии натощак, через 2 часа после еды гемоглобина были в районе компенсации и субкомпенсации в обеих группах как показано на рисунке 7, уровень гликемии через 2 часа после еды в группе больных с генотипом 4b4b была слегка выше и все же ДН в этой группе наблюдалась меньше. Показатели гликированного гемоглобина в обеих группах были на уровне декомпенсации по стандартам ADF и EASD. И это может говорить о роли генетической предрасположенности к ДН в группе 4a4b.

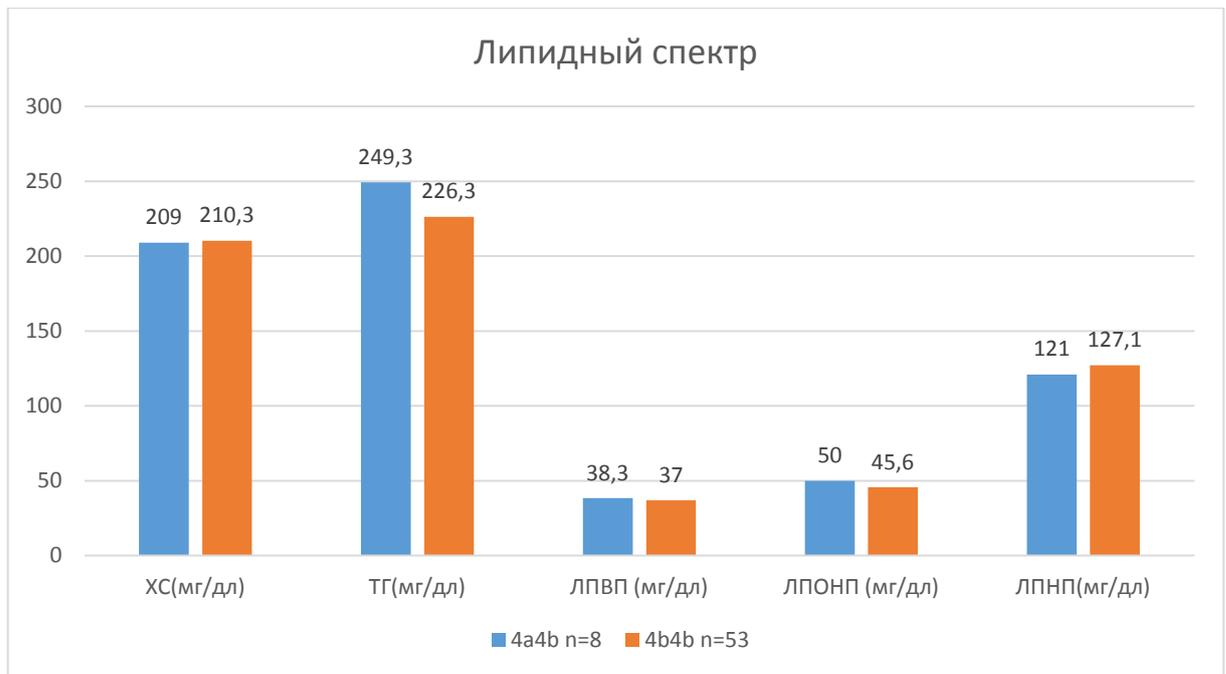


Рис.8. Показатели липидного спектра у больных СД2 узбекской национальности в зависимости от генотипов.

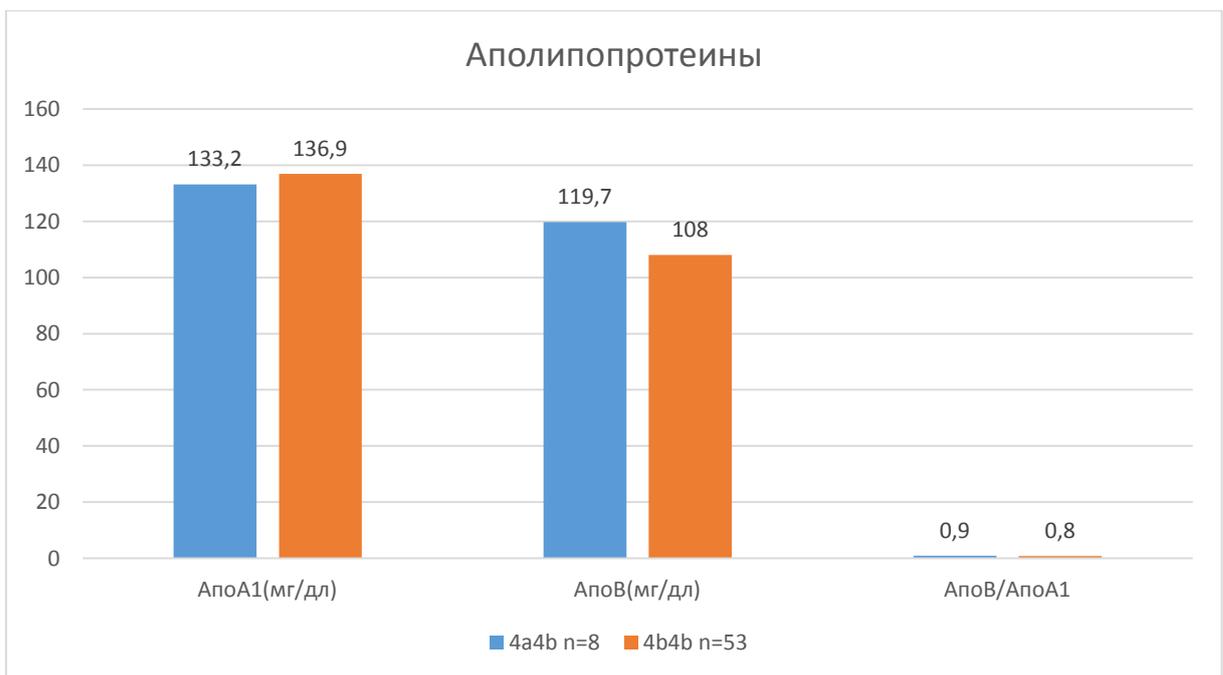


Рис.9. Показатели аполипопротеидов и соотношения АпоВ/АпоА1 у больных СД2 узбекской национальности в зависимости от генотипов.

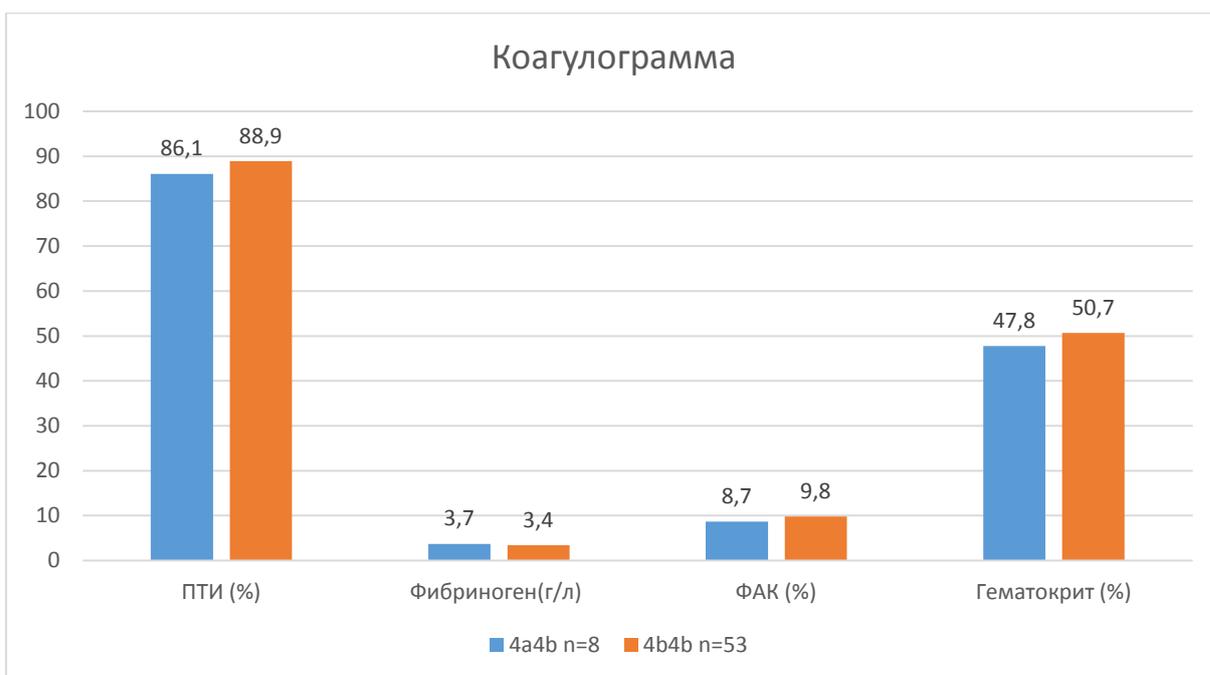


Рис.10. Показатели коагулограммы у больных СД2 узбекской национальности в зависимости от генотипов.

Таблица 7

Биохимические показатели у больных СД2 при различных генотипах гена eNOS

Показатели		4a4b n=8	4b4b n=53
Глюкоза натощак (ммоль/л)		7,2±0,9	7,2±0,4
Через 2 часа (ммоль/л)		9,3±1,5	9,6±0,5
HbA1c, (%)		7,8±0,5	7,8±1,6
Липидный спектр	ХС(мг/дл)	209±16,1	210,3±5,4
	ТГ(мг/дл)	249,3±29,2	226,3±16,6
	ЛПВП (мг/дл)	38,3±3,8	37,0±1,0
	ЛПОНП (мг/дл)	50±5,9	45,6±3,3
	ЛПНП(мг/дл)	121±13,0	127,1±4,9
АпоА1(мг/дл)		133,2±10,9	136,9±2,6
АпоВ(мг/дл)		119,7±12,1	108±3,9
АпоВ/АпоА1		0,9±0,01	0,8±0,02*

Креатинин(мкмоль/л)	109,6±12,7	100,0±4,03
ПТИ(%)	86,1±1,7	88,9±0,7
Фибриноген(г/л)	3,7±0,5	3,4±0,1
ФАК(%)	8,7±1,9	9,8±0,6
Гематокрит (%)	47,8±2,3	50,7±0,8

Примечание:* при $P<0,05$, ** при $P<0,01$, *** при $P<0,001$ по отношению к группе с 4a4b

Как видно из таблицы 7, уровень apoB и соотношения apoB к apoAI, были выше в группе больных с 4a4b генотипом ($P<0,05$), что свидетельствует о более высоком риске развития атеросклероза у этих лиц по сравнению с больными имеющими 4b4b генотип гена eNOS.

Гипергликемии отводится ведущая роль в развитии микро- и макрососудистых осложнений. Сегодня не вызывает сомнения необходимость достижения оптимального контроля гликемии для профилактики развития и нарастания тяжести ДН. Наиболее крупным исследованием, подтвердившем возможность предотвращения развития ДН у больных СД 1 типа при идеальной компенсации углеводного обмена, явилось исследование DCCT (Diabetes Control and Complication Study). У хорошо компенсированных больных на интенсивной инсулинотерапии риск развития МАУ был на 34%, а протеинурии на 43% ниже, чем в группе больных на традиционной инсулинотерапии. По данным аналогичного исследования среди больных СД 2 типа - UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), интенсивная тактика контроля гликемии у больных СД 2 типа, позволившая снизить гликированный гемоглобин до 7,0%, достоверно уменьшает частоту альбуминурии на 33%. Результаты недавно завершившегося исследования ADVANCE (The Actionin Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation) у больных с СД 2 типа также подтверждает этот факт. Достижение целевого уровня гликированного гемоглобина 6,5% позволило снизить частоту возникновения и прогрессирования нефропатии на 21%. Компенсация

углеводного обмена, играющая ключевую роль на начальных стадиях заболевания, продолжает сохранять свое значение даже на далеко зашедших стадиях осложнения. Больные СД с неудовлетворительным контролем гликемии в период, предшествующий началу диализа, имеют худший прогноз, чем пациенты с компенсацией углеводного обмена. Неадекватный гликемический контроль у больных на стадии ХПН чреват склонностью к инфекционным осложнениям, может приводить к резкому увеличению объема внеклеточной жидкости, включая механизм жажды. Жесткий контроль гликемии, начиная с дебюта СД и на протяжении всего заболевания, важен в предотвращении развития и прогрессирования почечных осложнений.

Гиперлипидемия - другой метаболический фактор прогрессирования ДН. Пациенты с СД имеют комплексные липидные нарушения: сниженный уровень липидов высокой плотности (ЛПВП), повышенный уровень триглицеридов (ТГ), липидов низкой плотности (ЛПНП), особенно выраженные при ДН. В отличие от больных СД 1 типа оптимальная компенсация углеводного обмена у больных СД 2 типа не приводит к нормализации дислипидемии. Это, по всей видимости, объясняет тот факт, что даже при отсутствии гипергликемии у больных с нарушенной толерантностью к углеводам, дислипидемия - одна из составляющих метаболического синдрома.

Установлено существование полной аналогии между процессом формирования гломерулосклероза и механизмом развития атеросклероза сосудов. Этому способствует структурное сходство мезангиальных клеток клубочков с гладкомышечными клетками артерий. С другой стороны, почечная патология приводит к развитию гиперлипидемии. В последние годы роль гиперлипидемии в развитии и прогрессировании ДН четко установлена.

Функциональные показатели у больных СД2 при различных генотипах гена eNOS

Функциональные показатели в группах с генотипами 4a4b и 4b4b гена eNOS не имели достоверной разницы (рис 11, 12), (таб.8).

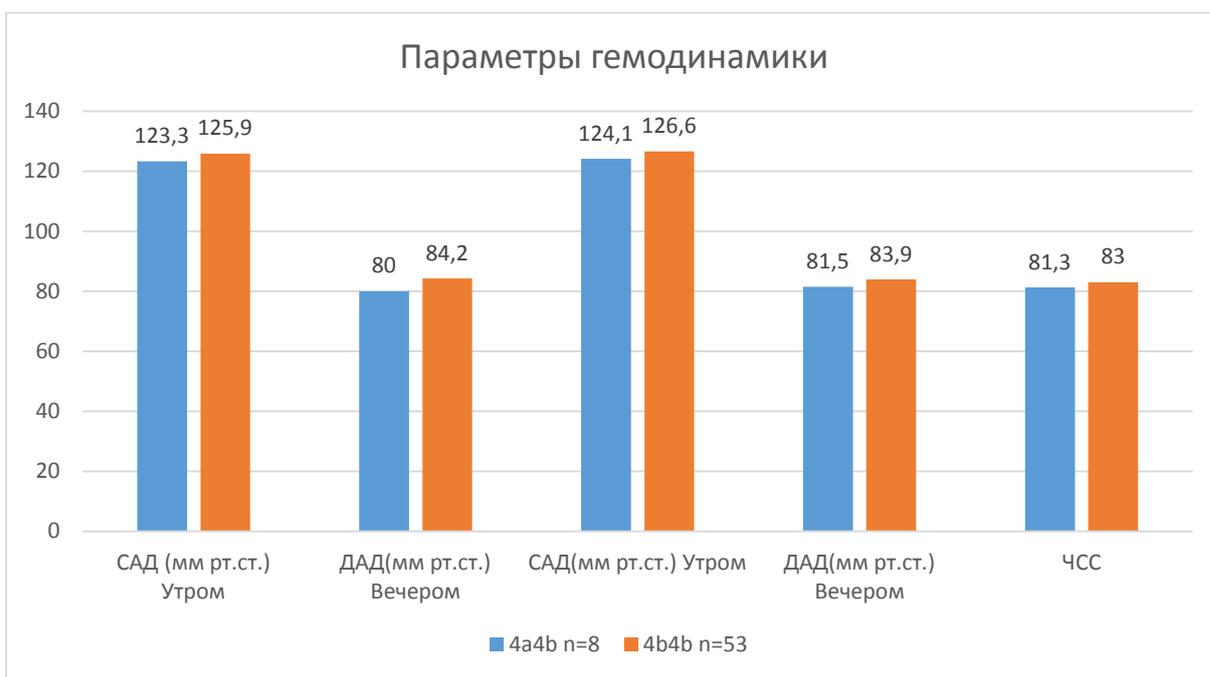


Рис.11. Показатели гемодинамики у больных СД2 узбекской национальности в зависимости от генотипов.

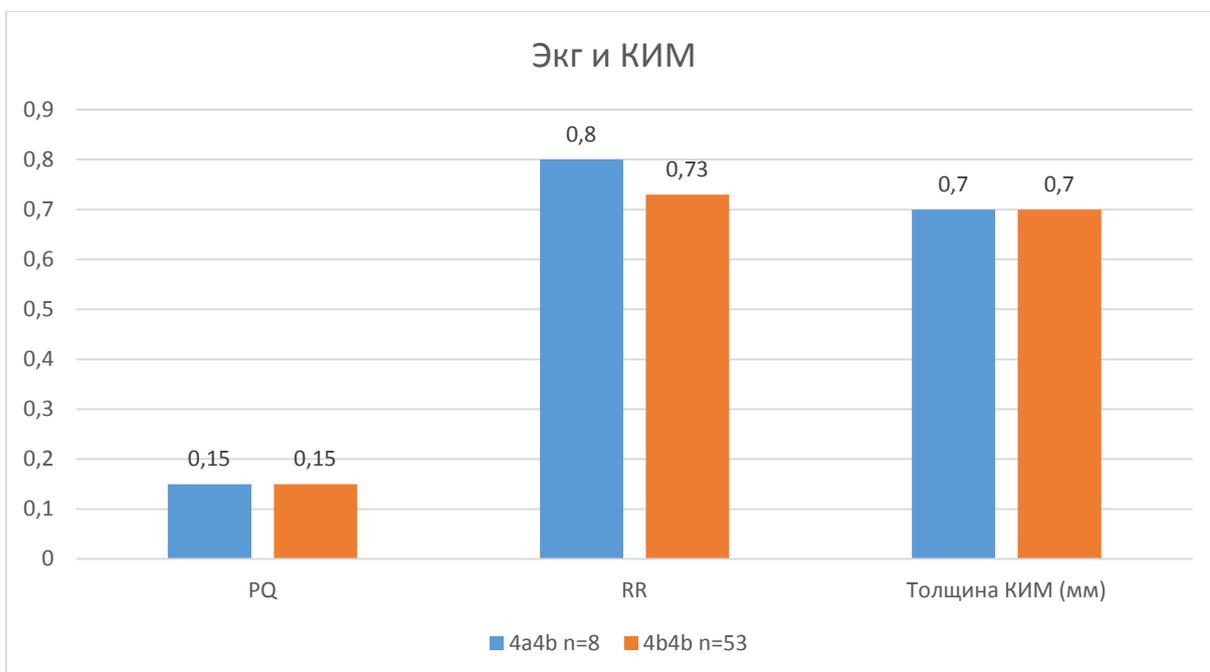


Рис.12. Функциональные показатели у больных СД2 узбекской национальности в зависимости от генотипов.

Функциональные показатели у больных СД2 при различных генотипах гена eNOS

Параметры		4a4b n=8	4b4b n=53
Утро	САД (мм рт.ст.)	123,3±2,1	125,9±2,2
	ДАД(мм рт.ст.)	80,0±0,5	84,2±1,9
Вечер	САД(мм рт.ст.)	124,1±2,0	126,6±2,4
	ДАД(мм рт.ст.)	81,5±1,5	83,9±0,9
ЧСС (уд.в мин)		81,3±3,2	83±1,5
ЭКГ	PQ	0,15±0,01	0,15±0,002
	RR	0,8±0,03	0,73±0,02
Толщина КИМ (мм)		0,7±0,14	0,7±0,03

Примечание: * при $P < 0,05$, ** при $P < 0,01$, *** при $P < 0,001$ по отношению к группе с 4a4b

Измерение толщины КИМ общих сонных артерий позволяет судить о выраженности ремоделирования магистральных сосудов. На сегодняшний день нет единого мнения о границе нормальных значений этого показателя: разные авторы называют величины от 0,8 до 1,0 мм [47]. Это, по-видимому, обусловлено как популяционными различиями, так и отсутствием единого общепринятого протокола проведения измерений. Включение в исследование больных с уже имеющейся выраженной ДН позволяло предполагать высокую частоту выявления утолщения КИМ общих сонных артерий. Однако в обследованной группе число пациентов с увеличением этого показателя, в зависимости от выбранной границы нормы, составляло от 2 до 5 человек, т.е. не более 10% всех обследованных. Выраженность процессов ремоделирования крупных сосудов у обследованных больных зависела в основном от гемодинамических факторов, давности гипертензии,

возраста, что согласуется с данными, полученными в исследовании ELSA [47].

Выводы к III главе

Результаты исследования показали, что мужчинам узбекской национальности больным СД2 ($n=61$) с продолжительностью заболевания $5,9\pm 0,75$ лет и в возрасте $49,9\pm 1,1$ лет. При анализе распределения частоты генотипов 4a4b полиморфного маркера гена eNOS было выявлено, что среди 61 больных сахарным диабетом 2-типа у 8 (13,1%) больных выявлен генотип 4a4b, диабетическая нефропатия выявлена у 5 (62,5%) из них, у преимущественно большинства. У 53 (86,9%) больных сахарным диабетом 2-типа выявили протективный генотип 4b4b, и именно в этой группе диабетическая нефропатия развилась в несколько раз меньше, то есть у 7 (13,21%) больных. 4a4b генотип был верифицирован у 8 (13,2%), 4b4b генотип у 53 (86,8%) больных, 4a4a генотип, который способствует развитию патологий вообще не выявлялся. При этом 4a аллель был выявлен в 8 (6,7%) случаях, 4b аллель в 114 (93,4%) случаях.

ИМТ, ОТ/ОБ не имели достоверной разницы в группах с генотипом 4a4b и 4b4b. Относительно тяжелая степень ожирения при СД2 наблюдалась в целом больше в группе с генотипом 4b4b, чем в группе больных с генотипом 4a4b ($P>0,05$). Ожирение III ст в группе больных с генотипом 4a4b отсутствовала.

Биохимические показатели в обеих группах не имели достоверной разницы кроме уровня apoB и соотношения apoB/apoAI, которые были выше в группе больных с 4a4b генотипом ($P<0,05$), что свидетельствует о более высоком риске развития атеросклероза у этих лиц по сравнению с больными имеющих 4b4b генотип гена eNOS

Относительно тяжелая степень ожирения II и III ст. при СД2 наблюдалась больше в группе с генотипом 4b4b, чем в группе больных с генотипом 4a4b. Ожирение III ст. в группе больных с генотипом 4b4b отсутствовало. Уровень apoB и соотношение apoB/apoAI были выше в группе больных с 4a4b генотипом ($P<0,05$), по сравнению с больными имеющих 4b4b генотип гена eNOS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рост распространенности СД отмечается и в Узбекистане. С 2007г. по 2010г. в Узбекистане количество зарегистрированных больных увеличилось на 15% и превысило 117 тысяч человек, что составляет 0,45% населения. Ежегодный прирост СД в Узбекистане составляет 5-6%. Эти данные не отражают действительной распространенности СД в Узбекистане. Эпидемиологические исследования распространенности СД, проведенные в Узбекистане, показывают, что истинное количество больных СД в несколько (5-6) раз выше по сравнению с зарегистрированными [3,20]. Это свидетельствует о том, что на каждого выявленного больного СД приходится 5-6 лиц с нераспознанным СД.

Основной причиной высокой инвалидизации и смертности больных СД 2 типа вне зависимости от возраста являются: сосудистые осложнения, так называемые макроангиопатии: ишемическая болезнь сердца (ИБС), инфаркт миокарда (ИМ), сердечная недостаточность, инсульт, периферические ангиопатии в виде атеросклероза магистральных сосудов ног и диабетические микроангиопатии: как нефропатия (ДН), ретинопатия (ДР), нейропатия (ДПНП). Эти осложнения развиваются в 4-6 раз чаще у больных СД 2 типа по сравнению с лицами, не страдающими СД.

Поиск генетических маркеров предрасположенности или, напротив, устойчивости к заболеваниям – одна из наиболее актуальных задач медицинской науки. Это определяется тем, что установление таких маркеров открывает возможность клиницистам формировать группы риска развития заболеваний, а при некоторых патологиях устанавливать индивидуальный прогноз или диагноз (в том числе до клинической манифестации заболеваний). Оценка роли того или иного генетического маркера при СД зависит от расово-этнических вариаций частот встречаемости аллелей и генотипов в исследованных популяциях [30,68]. В последние годы в литературе широко обсуждается генетический риск развития СД и его осложнений в зависимости от генов инсулинорезистентности, генов

определяющих пониженный уровень инсулина, полиморфизма гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) у пациентов с обоими типами сахарного диабета [14,16].

Известно, что ген эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) участвует в синтезе NO эндотелием и, следовательно, в регуляции сосудистого тонуса, кровотока и артериального давления. NO, возможно, имеет значение и в патогенезе ИБС, поскольку угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток, а также обладает протекторным эффектом в отношении агрегации тромбоцитов и ингибирует адгезию лейкоцитов к эндотелию. Подавление или снижение активности eNOS приводит к недостатку оксида азота — дисфункции эндотелия, которой согласно классической теории «ответ на повреждение» отводится основная роль в инициации атерогенеза, а также развитии атеротромбоза [46,55,56,53].

Мета-анализ оценки связи между аллелями 4a и 4b гена eNOS проведенные в подгруппах по признаку этнической принадлежности дал основание предположить, что 4a/4b полиморфизм в гене eNOS ассоциируется с восприимчивостью к ДН в азиатских, но не в кавказоидных популяциях [48].

В нашем исследовании для изучения распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера eNOS у здоровых и при СД 2 типа узбекской национальности во взаимосвязи с анамнестическими, антропометрическими, гемодинамическими, биохимическими и функциональными показателями разработаны 2 протокола исследования: Протокол 1 для изучения распределения генотипов гена eNOS при СД2 мужчин узбекской национальности Протокол 2 для изучения генотипов указанного гена у практически здоровых мужчин узбекской национальности.

Проведено обследование и генотипирование (гена eNOS) 109 мужчин, из которых 61 явились больными СД2 и 48 практически здоровых узбекской национальности.

Проведен анализ инсерционно-делеционного полиморфизма гена eNOS, при изучении распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера гена eNOS у больных СД2 4a4b генотип был верифицирован у 13,2% больных, 4b4b генотип у 86,8% больных, 4a4a генотип не выявлялся. При этом 4a аллель был выявлен в 6,7% случаев, 4b аллель в 93,4% случаев. В группе здоровых мужчин узбекской национальности выявлено содержание 4a4a генотипа – 2,1% случаев, 4a4b генотип выявлялся в 14,6% случаев, содержание 4b4b генотипа в 83,3% случаев. Частота 4a аллеля составила 7,4%, а 4b аллеля 92,6%. Между исследованными группами здоровых мужчин и больных СД2 узбекской национальности, не по аллелям, не по представленности генотипов достоверной разницы не было, за исключением, того, что в группе здоровых мужчин генотип 4a4a наблюдался в одном случае (2,1%), а при СД2 отсутствовал.

Среди 61 больных сахарным диабетом 2-типа у 8 (13,1%) больных выявлен генотип 4a4b, диабетическая нефропатия выявлена у 5 (62,5%) из них, у преимущественно большинства. У 53 (86,9%) больных сахарным диабетом 2-типа выявили протективный генотип 4b4b, и именно в этой группе диабетическая нефропатия развилась в несколько раз меньше, то есть у 7 (13,21%) больных. Полученные данные свидетельствуют что развитие нефропатия может быть генетически детерминировано имени генотипом 4a4b.

Клинико-биохимические параметры больных СД2 при различных генотипах гена eNOS имели следующие различия. Относительно тяжелая степень ожирения II и IIIст. при СД2 наблюдалась больше в группе с генотипом 4b4b, чем в группе больных с генотипом 4a4b. Ожирение IIIст. в группе больных с генотипом 4b4b отсутствовало. Уровень apoB и соотношение apoB/apoAI были выше в группе больных с 4a4b генотипом ($P < 0,05$), по сравнению с больными имеющих 4b4b генотип гена eNOS.

Значимость полученных данных свидетельствует о необходимости этих исследований при сахарном диабете 2-типа у мужчин узбекской национальности. Наличие такого генотипа позволяет отнести их обладателей в группу риска развития диабетической нефропатии. На основании чего именно у них должны быть проведены профилактические меры предупреждения диабетической нефропатии, который заключается в нормализации в первую очередь гликемии, строгого контроля артериального давления, даже при отсутствии повышения артериального давления назначать ингибиторы АПФ, наладить определение микроальбуминурии для ранней диагностики, по результатам определение липидного спектра - назначать гиполипидемические препараты, при наличии воспалительных процессов в мочевыделительном тракте - тщательное их лечение.

ВЫВОДЫ

1. Распределение частот генотипов: 4b4b генотип у 53 (86,8%) больных, 4a4b генотип был верифицирован у 8 (13,2%), 4a4a генотип гена eNOS, который способствует развитию атеросклеротических патологий не встречался у данных больных СД узбекской национальности.
2. Относительно тяжелая степень ожирения II и IIIст при СД2 наблюдалась больше в группе с генотипом 4b4b, чем в группе больных с генотипом 4a4b. Ожирение IIIст. в группе больных с генотипом 4b4b отсутствовало.
3. Уровень apoB и соотношение apoB/apoA1 были выше в группе больных с 4a4b генотипом ($P < 0,05$), по сравнению с больными имеющих 4b4b генотип гена eNOS что свидетельствует о более высоком риске развития атеросклероза у этих лиц по сравнению с больными имеющих 4b4b генотип гена eNOS.
4. Все больные СД2 с относительно тяжёлой стадией нефропатии (n-5) имели генотип 4a4b, следовательно 4a4b генотип гена eNOS по предварительным данным имеет клинико-диагностическое значение в развитии ДН и ХПН при СД 2 типа узбекской национальности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Поиск генетических маркеров предрасположенности или, напротив, устойчивости к заболеваниям – одна из наиболее актуальных задач медицинской науки. Это определяется тем, что установление таких маркеров открывает возможность клиницистам формировать группы риска развития заболеваний, а при некоторых патологиях устанавливать индивидуальный прогноз или диагноз (в том числе до клинической манифестации заболеваний).
2. Оценка роли того или иного генетического маркера при СД зависит от расово-этнических вариаций частот встречаемости аллелей и генотипов в исследованных популяциях. В последние годы в литературе широко обсуждается генетический риск развития СД и его осложнений в зависимости от генов инсулинорезистентности, генов определяющих пониженный уровень инсулина, полиморфизма различных генов, в частности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) у пациентов с обоими типами сахарного диабета.
3. Наличие такого генотипа позволяет отнести их обладателей в группу риска развития диабетической нефропатии. На основании чего именно у них должны быть проведены профилактические меры предупреждения диабетической нефропатии, который заключается в нормализации в первую очередь гликемии, строгого контроля артериального давления, даже при отсутствии повышения артериального давления назначать ингибиторы АПФ, наладить определение микроальбуминурии для ранней диагностики, по результатам определение липидного спектра - назначать гиполипидемические препараты, при наличии воспалительных процессов в мочевыделительном тракте - тщательное их лечение.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Статья. Полиморфизм гена эндотелиальной синтазы оксида азота у мужчин, больных сахарным диабетом 2 типа, узбекской национальности. Салахов Т.А., Тахирова Ф.А., Айходжаева М.А., Акбаров З.С., Рахимова Г.Н. Терапевтический вестник Узбекистана. 2011г., №2-3, стр.176-177.
2. Тезис. Определение полиморфизма гена eNOS (оксида азота) у мужчин с сахарным диабетом 2 типа узбекской национальности. Салахов Т.А., Бурнашева А.Р. Магистратура резидентлари ва клиник ординаторларнинг X – илмий амалий анжумани. 2012. Стр-137.
3. Тезис. Полиморфизм гена эндотелиальной синтазы оксида азота у мужчин больных сахарным диабетом 2 типа узбекской национальности. Салахов Т.А. «Илмий кашфиётлар йўлида» Ёш олимлар илмий-амалий анжумани. 2013. Стр-372.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Произведения Президента Республики Узбекистан

1. И.А.Каримов. Высокая духовность – непобедимая сила.-Т.2008.-С.80.
2. Национальная модель охраны здоровья матери и ребенка в Узбекистане. Выступление И.А.Каримова в 26.11.11г. во дворце Симпозиумов.

Основная литература:

3. Шестакова М.В., Шахмалова М.Ш. Диабетическая нефропатия: клиника, диагностика, лечение. Москва 2009
4. Абдуллаева Г.Ж. Анtireмоделирующая эффективность эналаприла у больных эссенциальной гипертонией с учетом I/D-полиморфизма гена АПФ. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ташкент, 2005.- 25с.
5. Бойцов С.А., Кириченко П.Ю., Кузнецов А.Е. Исследование I/D полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента и А/С полиморфизма гена рецепторов I типа ангиотензина II у больных с хронической сердечной недостаточностью различных функциональных классов, развившейся на фоне ИБС//Сердечная Недостаточность. – 2006. – Т.4, № 2. – С. 98-102.
6. Исмаилов С.И., Султанов Б.А., Хайдарова Ф.А. Распространенность сахарного диабета и НТГ среди жителей г. Карши // Проблемы биологии и медицины. -2004.- №2, (34).-С.21-22.
7. Исмаилов С.И., Акбаров З.С., Рахимова Г.Н., Алиханова Н.М., Рахимджанова М.Т. Мухамедова Ф.А., Касымов У.А., Каюмова Д.Т., Алимова Н.У., Алиева А.В., Тахирова Ф.А., Салахов Т.А. Сахарный диабет в Узбекистане VIII Саммит руководителей Восточно-Европейских диабетических ассоциаций «Единство во благо», 54 стр. 2010г.
8. Истрати В., Манеа Д., Барбакаръ Н., Каленич О., Иким А. Полиморфизм I/D гена ангиотензин II превращающего фермента и его роль в ишемической болезни сердца//Український терапевтичний журнал.- 2004.- №3.- С.37-40.

9. Котовская Ю.В., Кобалаева Ж.Д., Сергеева Т.В. и др. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы и гена эндотелиальной NO-синтазы и макрососудистые осложнения при сахарном диабете типа 2. Артериальная гипертензия. 2002. Т.8, №3. С.86-90.
10. Кузнецова Т., Jan A. Staessen, J.G.Wangi и др. Полиморфизм (типа вставка/отсутствие вставки) гена ангиотензинпревращающего фермента и риск сердечно-сосудистых и почечных заболеваний. Кардиология, 7, 1998, стр.61-74.
11. Каримова И.А. Влияние небиволола на дисфункцию эндотелия у больных эссенциальной гипертонией с учетом полиморфизма гена NO-синтазы. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ташкент, 2005.- 25с.
12. Каюмова Д.Т. Сосудистые поражения у лиц с промежуточными гипергликемиями и у вновь выявленных больных сахарным диабетом. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ташкент – 2008.- 19с.

Дополнительная литература:

13. Мелентьев И.А., Вершинин А.А., Колесникова Е.А., Мелентьев А.С., Малыгина Н.А., Костомарова И.В., Зайцев В.П. Клиническое течение ишемической болезни сердца, постинфарктное ремоделирование, психологический статус и сроки госпитализации у больных с различными генотипами гена ангиотензинпревращающего фермента //Российский кардиологический журнал.- 2006.- №3.- С.6-16.
14. Мустафина О.Е., Шагисултанова Л.И., Насибулин Т.Р. и др. Полиморфизм мини-сателлита гена эндотелиальной синтазы окиси азота: исследование в популяциях Волго-Уральского региона и анализ ассоциаций с инфарктом миокарда и эссенциальной гипертензией. Генетика 2001;4:1—7.
15. Минушкина Л.О., Затейщиков Д.А., Сидоренко Б.А. Генетические аспекты регуляции эндотелиальной функции при артериальной гипертонии. Кардиология 2000;3:68—75.

16. Моисеев В.С., Демуров Л.М., Кобалава Ж.Д. и др. Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента у больных с гипертензией, гипертрофией левого желудочка и развитие инфаркта миокарда в молодом возрасте. Тер. архив, 1997; 69 (9): 18–23.
17. Майоров А.Ю. Состояние инсулинорезистентности в эволюции сахарного диабета 2 типа. Автореф. дис. док. мед. наук. Москва – 2009.- 25с.
18. Никитина Л.О., Балаболкин М.И., Кондратьев Я.Ю. и др. Полиморфизм гена ангиотензин I-превращающего фермента при инфаркте миокарда у больных сахарным диабетом типа 2. Проблемы эндокринологии. -1998.- Т.44, №6. Стр.13-16.
19. Потапов В.А. Поиск генетических маркеров, определяющих предрасположенность к сахарному диабету типа 2. Автореф. дис. канд. мед. наук. Москва – 2010.- 24с.
20. Руководство IDF по контролю поспрандиальной гипергликемии в плазмекрови.// International Diabetes Federation, -2007.
21. Рахимова Г.Н., Садыкова А.С., Мухаммедов Р.С., Нурматов Ш.Т. Ассоциация полиморфных маркеров I/D гена ACE с развитием диабетической нефропатии у детей и подростков с СД 1 типа узбекской национальности//Проблемы биологии и медицины.-2007.-1. стр.86-88.
22. Рахимова Г.Н., Сулейманова Ф.Н., Мухамедов Р.С., Бурнашева А.Р., Тахирова Ф.А. Распределение аллелей и генотипов гена эндотелиальной синтазы оксида азота у детей и подростков с экзогенно-конституциональным ожирением узбекской национальности. Мат. конф. «Актуальные проблемы терапевтических заболеваний», 18-19 ноября 2011г. Терапевтический вестник Узбекистана.
23. Султанов Б.А. Распространенность СД 2 типа и НТГ в трех городах Республики Узбекистан. //Автореферат на соискание степени к.м.н., Ташкент, -2008, 20с.

24. Степанов В.А., Пузырев К.В., Спиридонова М.Г. и др. Полиморфизм генов ангиотензинпревращающего фермента и эндотелиальной синтазы окиси азота у лиц с артериальной гипертензией, гипертрофией левого желудочка и гипертрофической кардиомиопатией. Генетика 1998;11:1578—1581.
25. Хайдарова Ф.А. Клинико-эпидемиологические аспекты поздних осложнений сахарного диабета.// Автореферат на соискание степени к.м.н., Ташкент.-1998, -20с.
26. Чистяков Д.А., Воронько О.Е., Савостьянов К.В. и др. Полиморфные маркеры генов эндотелиальной NO-синтазы и сосудистого рецептора ангиотензиногена II и предрасположенность к ишемической болезни сердца. Генетика. 1999г.
27. Шестакова М.В., Шамхалова М.Ш. Диабетическая нефропатия: клиника, диагностика, лечение // Методическое пособие. Москва, 2009г.- 29с.
28. Щеглова Е.В. Клиническое и прогностическое значение полиморфизма некоторых генов-кандидатов и маркеров эндотелиальной дисфункции у больных, перенёсших острый коронарный синдром): Автореф. дис....канд. мед. наук. Владикавказ, 2008.- 25с.
29. Щеглова Е.В., Боева О.И. Возможности прогнозирования неблагоприятного исхода у больных, перенёсших острый коронарный синдром//Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2007. -№3. - С. 19-23.
30. Alberti G., Zimmet P., Shaw J. IDF. Epidemiology Task fores consensus group. The metabolic syndrome – a new worldwide definition //Lancet. – 2005. – Vol.366 – P. 1059-1062.
31. Adams TD, Yanivitz FG, Fisher AG. et al. Heritability of cardiac size: echocardiographic and electrocardiographic study of monozogotic and dizigotic twins. Circulation 1985; 71: 39–44.

32. Allermann Y, Aeschbacher B, Zwysing P. et al. Left ventricular structure and determinants in normotensive offspring of essential hypertensive patients. *J Hypertens* 1992; 10: 1257–64.TCF7L2.
33. Andre Gustavo P. Sousa, Guilherme F. Marquezine, Pedro A. Lemos et al.TCF7L2 Polymorphism rs7903146 is associated with Coronary Artery Disease Severity and Mortality//*Plos one* 2009.// PubMed
34. ADVANCE trial. //Lancet.-2007.-V.370.-P.829-840.
35. American Diabetes Association. Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes study. //DiabetesCare -1999. –V.22. Suppl.1.- P. 27- 31.
36. Barley J., Blackwood A., Carter N., Crews D., Cruickshank J., Jeffery S., Ogunlesi A. Sagnella G. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin//*J Hypertens.*- 1994.- Vol.12.- P.955-957.
37. Cai H., Wilcken D.E., Wang X.L. The Glu298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J MolMed.* 1999 Jun;77(6):511-4.
38. Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, Frayling TM, Yajnik CS. Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population.*Diabetologia.* 2007 Jan; 50(1):63-7. Epub 2006 Nov 9.
39. Cauchi S, Meyre D, Dina C, Choquet H, Samson C, Gallina S, Balkau B, Charpentier G, Pattou F, Stetsyuk V, Scharfmann R, Staels B, Frühbeck G, Froguel P. Transcription factor TCF7L2 genetic study in the French population: expression in human beta-cells and adipose tissue and strong association with type 2 diabetes.*Diabetes.* 2006 Oct; 55(10):2903-8.
40. Colagiuri S, Cull CA, Holman RR. Are lower fasting plasma glucose levels at diagnosis of type 2 diabetes associated with improved outcomes? U.K. prospectivediabetesstudy 61. //DiabetesCare.- 2002. –V.25. -P1410-1417.
41. ChowdhuryT., Dyer Ph., Kumar S. Genetic determinants of diabetic nephropathy.// *Clinical Science.* -1999. -V. 96. -P. 221 – 230.

42. European Diabetes Policy Group. Guidelines for a desktop guide to type 2 Diabetes Mellitus.-International Diabetes Federation European Region.-1998-1999.
43. Fysekidis M., Hadjadj S., Roussel R. ACE I/D polymorphism predicts end stage renal disease and or mortality in type 1 diabetic patients except for those with already advanced nephropathy: the follow up of the Genesis/Genediab Studies//The European Association for the study of Diabetes.-Abstract Volume 43 Annual Meeting.-Amsterdam.-2007.-S. 157.
44. Florez J.C. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? // *Diabetologia*. 2008. V. 51. P. 1100–1110.
45. Granath B., Taylor R.R., van Bockxmeer F.M., Mamotte C.D. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J CardiovascRisk*. 2001 Aug;8(4):235-41.
46. Grant S.F., Thorleifsson G., Reynisdottir I. et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes // *Nat. Genet*. 2006. V. 38. P. 320–323.
47. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006 Mar; 38(3):320-3. Epub 2006 Jan 15
48. Hadjadj S., Tarnow L., Forsblom C., Kazeem G., Marre M., Groop P., Parving H. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and diabetic nephropathy: case-control, haplotype, and family-based study in three European populations//EURAGEDIC (European

- Rational Approach for Genetics of Diabetic Complications) Study Group. 2004.- 23p.
49. Harrison D.G. (1997) Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 100(9): 2153–2157.
 50. Hou L., Osei-Hyiaman D., Yu H., et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in eNOS gene with ischemic stroke in Chinese patients. *Neurology*. 2001 Feb 27;56(4):490-6.
 51. He Y., Fan Z., Zhang J., Zheng M., Zhang D., Gu S., Yang H. Polymorphisms of eNOS gene are associated with diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Oxford Journals, Life Sciences Medicine*, Том 26, выпуск 2 . Стр. 339-349.(01)
 52. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*. 2007 Apr; 50(4):747-51. Epub 2007 Jan 24.
 53. Holman R, Turner R, Stratton I. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: United Kingdom prospective diabetes study for United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. // *B.M.J.* -1998. -N 317. -P. 713-720.
 54. IDF Diabetes Atlas. Fourth edition, 2009, 101 p.
 55. Ichihara S., Yamada Y., Fujimura T., et al. Association of a polymorphism of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol*. 1998 Jan 1;81(1):83-6.
 56. Jeerooburkhan N., Jones L.C., Bujac S. et al. (2001) Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*, 38(5): 1054–1061.(2)
 57. Jin T., Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus // *Mol. Endocrinol*. 2008. V. 22. P. 2383–2392.

58. Luscher T.F., Tschudi M.R., Wenzel R.R., Noll G. (1997) Endothelial dysfunction and nitrogen monoxide (NO; nitric oxide). *Internist (Berl.)*, 38(5): 411–419.
59. Mehta J.L., Li D.Y. (1999) Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain? *Cardio-vasc. Res.*, 43(2): 291–299.
60. Munoz J, Lok KH, Gower BA, Fernandez JR, Hunter GR, Lara-Castro C, De Luca M, Garvey WT. Polymorphism in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with reduced insulin secretion in nondiabetic women. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12):3630-4.
61. Nikzamir A., Nakhjavani M., Golmohamadi T., Dibai L. Association of Angiotensin-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism with Metabolic Syndrome in Iranians with Type 2 Diabetes Mellitus//*Arch Iranian Med.*- 2008.- Vol.11, N1.- P. 3-9.
62. Poirier O., Mao C., Mallet C., et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest*. 1999 Apr;29(4):284-90.
63. Parving H-H, Osterby R, Ritz E. Diabetic nephropathy. In: Brenner BM, ed. *The kidney*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000:1731-73.
64. Staessen J., Wang J., Ginocchio G., Petrov V., Saavedra A. The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk//*J Hypertens.* – 1997.-Vol.15,N 12 Pt 2.- P.1579-1592.
65. Scott L.J., Bonnycastle L.L., Willer C.J. et al. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finish sample // *Diabetes*. 2006. V. 55. P. 2649–2653.
66. Tamara S. Hannon MD, Coutham Rao, MD and Silva A. Arslanian MD. Childhood Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. // *Pediatrics*.-2005.-№.2.- Vol.116 .-P. 473-480.
67. Turner R. C, Millns H. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom prospective diabetes study

- (UKPDS: 23) for the United Kingdom Prospective Diabetes Study Group.// BritishMedicalJournal. -1998. -N.316. -P. 823-828.
68. U.S. Renal Data System. USRDS 2001 Annual Data Report: atlas of end-stage renal disease in the United States. Bethesda, Md.: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2001.
 69. Van Vliet-Ostapchouk JV, Shiri-Sverdlov R, Zhernakova A, Strengman E, van Haeften TW, Hofker MH, Wijmenga C. Association of variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) with susceptibility to type 2 diabetes in the Dutch Breda cohort. *Diabetologia*. 2007 Jan; 50(1):59-62. Epub 2006 Oct 10.
 70. WHO. Screening for Type 2 Diabetes. Report of a World Health Organization and International Diabetes Federation meeting. WHO/NMH/MNC/03.1 Geneva: //WHO Department of Noncommunicable Disease Management, - 2003.
 71. Wu L.S (69) Wu L.S., Hsieh C.H., Pei D, Hung Y.J., Kuo S.W., Lin E. Association and interaction analyses of genetic variants in ADIPOQ, ENPP1, GHSR, PPARgamma and TCF7L2 genes for diabetic nephropathy in a Taiwanese population with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*, 2009 Nov; 24(11):3360-6.
 72. Yahashi Y., Kario K., Shimada K., Matsuo M. The 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial cell nitric oxide synthase gene and ischemic stroke in a Japanese population. *BloodCoagulFibrinolysis*. 1998 Jul;9(5):405-9.
 73. Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Meigs JB, Manson JE, van Dam RM, Hu FB. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes*. 2006 Sep; 55 (9):2645-8.

ПРИЛОЖЕНИЯ.

Протокол 1

Исследование по изучению распределения генотипов генов eNOS при СД 2
типа узбекской национальности.

Критерии включения в исследование:

СД 2 типа, возраст старше 45 лет, узбекская национальность, мужской пол

Критерии не включения в исследование:

СД 1 типа, возраст младше 45 лет, неузбекская национальность, женский пол

I ИДЕНТИФИКАЦИЯ	
1. Номер а/к, ИБ _____ 2. Ф.И.О _____ _____	3. дата рожд « ____ » _____ » ____ Г 4. Адрес _____ _____ _____
II СВЕДЕНИЯ О ЗАБОЛЕВАНИИ И ЛЕЧЕНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА	
1. Год установления диагноза _____ Г 2. Год начала инсулинотерапии _____ Г 3. Наследственность по: Сахарному диабету: 1-есть 2-нет Ожирению: 1-есть 2-нет Гипертонии: 1-есть 2-нет ИБС: 1-есть 2-нет ПИКС: 1-есть: 2-нет 4. Рост _____ см, 5. Вес _____ кг, 6. ИМТ _____ кг/м ² 7. ОТ _____ см, 8. ОБ _____ см, 9. ОТ/ОБ _____ 10. АД мм.рт.ст.(утро) ____/____, АД(веч.) ____/____, 11. Проводилось ли нижеследующее лечение: 1- гипотензивное: а) ингибиторы АПФ,	14. Использование сахароснижающих препаратов: Препарат утром днём вечером 1-бигуаниды ____табл ____табл ____табл 2-сульфанилмочевины _____табл _____табл _____табл 3-меглитиниды _____табл _____табл _____табл 4-тиазолидиндионы _____табл _____табл _____табл 5-ингибиторы α-глик _____табл _____табл _____табл 15. Инсулинотерапия: Вид инсулина _____ Доза: утром днём вечером 1-короткий ____ ЕД ____ ЕД ____ ЕД 2-продлённый ____ ЕД ____ ЕД 3-смешанный ____ ЕД ____ ЕД ____ ЕД

<p>б) β-бло- окаторы, в) кальций блокаторы, г) диуретики, д) α-блокаторы, е) блокаторы рецепторов АТ2, ж) другие 2-гиполипидемическое: а) статины, б) фибраты, в) никотиновая кислота, г) другие 3-антиангинальное</p>	<p>16. Сопутствующие заболевания _____ _____ _____ _____ 17. Сопутствующее лечение _____ _____ _____ 18. Вредные привычки: курение - 1- да 2 –нет Алкоголь: 1-нет 2- в меру 3-злоупотребляет</p>
III ОСЛОЖНЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА	
<p>1 РЕТИНОПАТИЯ 1- нет2- да 3- непролиферативная 4- препролиферативная 5- пролиферативная 6- слепота на 1 или 2 глаза вследствие ретинопатии _____ г. 7- лазеркоагуляция 1-нет 2-есть _____ г.</p>	<p>2 КАТАРАКТА 1- нет2- да 3- отсутствие зрения на 1 или 2 глаза вследствие катаракты 4- экстракция катаракты на 1 глаз _____ г. 5- экстракция катаракты на 2 глаза _____ г.</p>
<p>8-другая терапия _____ _____ _____ 4 НЕФРОПАТИЯ 1 - микроальбуминурия - 1-нет 2-есть 2- протеинурия - 1-нет 2-есть 3- ХПН –0 ХПН – 1 ХПН – 2 ХПН – 3 4- диализ _____ г. 5- трансплантация почки _____ г. 6 СЕНСОРНАЯ НЕЙРОПАТИЯ</p>	<p>3 АВТОНОМНАЯ НЕЙРОПАТИЯ 1-нет 2-да а)- ортостатическая гипотензия б)- диарея в)- атония мочевого пузыря г)- импотенция Д)-амиотрофия 5 ДИАБЕТИЧЕСКАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ: 1-нет 2-да 3- ДЭ I 4- ДЭ II, 5-ДЭ III 7 МАКРОАНГИОПАТИЯ НК по пульсации артерий стоп1-нет 2-да</p>

1- нет 2 –да 8 СИНДРОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ	9 АМПУТАЦИЯ 1-нет 2-да 2-пальца _____ г. 3- голени _____ г.
СТОПЫ дата 1-нет 2-да 3 - нейропатическая форма 4 - ишемическая форма 5- нейроишемическая форма 10 СТЕНОКАРДИЯ 1- нет 2- да _____ г. 3- напряжения (прогрессирования)___ г. 4- покоя _____ г. 5 - ФК I, 6 – ФК II, 7 – ФК III, 8 – ФК IV 13 ИНСУЛЬТ 1-нет 2- да _____ г.	4- бедра _____ г. 11 ИНФАРКТ МИОКАРДА 1-нет 2- да _____ г. 3-повторный _____ г. 12ХСН 1-нет 2- да 3 - ФКI, 4 – ФКII, 5 – ФКIII, 6 – ФКIV 14 ГИПЕРТОНИЯ 1- нет 2- да 3- АГ 1, 4 - АГ 2, 5 - АГ3 6- ГБI, 7- ГБII, 8 - ГБIII
IV ЛАБОРАТОРНЫЕ ДАННЫЕ	
1 Гликемия натощак (ммоль/л):	15 СКФ (по Кокрофту-Голту)
2 через 2 часа после еды	16 Фибриноген
4. Гликированный гемоглобин HbA1c (%)	17 Гематокрит
4 Холестерин	18 Тромботест
5 Триглицериды	19 ФАК
6 ЛПВП	20 ПТИ
7 ХСЛОНП	21 ИРИ: - натощак
8 ЛПНП	- после еды
9 АпоА1	22 ЧСС
10 АпоВ	23 ЭКГ:- PQ
11 Апо В/Апо А1	- RR
12 Креатинин	24. Толщина интима медиа КИМ
13 Протеинурия (ОАМ)	(мм)
14 Проба Нечипоренко	25. Генотип гена eNOS
- лейкоциты	
- эритроциты	

Врач-исследователь _____ / _____ /

Дата заполнения карты «__» _____ » 20__ г

Протокол 2

Исследование по изучению распределения генотипов гена eNOS у
практически здоровых мужчин узбекской национальности

Критерии включения в исследование:

Мужской пол, узбекская национальность, возраст более 45 лет без ожирения (ИМТ < 30 кг/м²), без артериальной гипертонии (АД < 140/90 мм ртст), без ИБС (без стенокардии и ИМ), без серьезных патологий сетчатки глаза, без острых заболеваний.

Критерии не включения в исследование:

Женский пол, неузбекская национальность, возраст менее 45 лет, с наличием ожирения, с ИБС, с АГ, с поражением сетчатки глаз, с острыми заболеваниями, с наличием первой степени родства с больными СД 2 типа.

ФИО _____

Дата запол. пр. _____

Домашний адрес _____ тел. _____

1. Дата рождения _____ Возраст _____

2. Рост _____ см 3. Вес _____ кг 4. ИМТ _____ кг/м² 5. ОТ _____ см

6. ОБ _____ см 7. ОТ/ОБ _____

8. Артериальное давление _____ мм ртст

9. Глюкоза крови натощак: _____ ммоль/л,
через 2 часа после еды _____ ммоль/л

10. Гликированный гемоглобин (HbA1c) _____ %

11. ЭКГ _____

12. Общий анализ мочи (белок в моче) _____

13. Проба Нечипоренко _____

14. Консультация окулиста _____

15. Липидный спектр: 1. Холестерин _____ ммоль/л.

2. Триглицериды _____ ммоль/л. 3. ЛПВП _____ ммоль/л. 4. ЛПНП _____ ммоль/л.

16. Генотип гена eNOS _____

17. Имели ли вы когда-нибудь резкие боли или неприятные ощущения в грудной клетке? 1=ДА 2=НЕТ

а) Если нет отмечали ли вы, какое либо чувство давления или тяжести в грудной клетке? 1=ДА 2=НЕТ

Если нет переходите к вопросу 2.

б) Имеете вы эти ощущения при быстрой ходьбе или когда поднимаетесь на возвышенность или по лестнице? 1=ДА 2=НЕТ

Если нет переходите к вопросу 2.

в) Имеете вы эти ощущения при обычном шаге на ровной поверхности? 1=ДА 2=НЕТ

г) Что вы делаете при этих болях или ощущениях, если вы идете?

1=останавливаетесь или замедляете шаг. 2=продолжаете идти

(Если больной принимает нитроглицерин, необходимо занести в ячейку цифру 1 как признак остановки или замедления шага).

Если продолжаете идти, переходите к вопросу 2.

д) Если вы останавливаетесь, что происходит? 1= наступает облегчение 2=нет облегчения

Если нет облегчения, переходите к вопросу 2.

19. Были ли у вас когда-нибудь очень сильные боли, пронизывающие клетку спереди назад и продолжавшиеся полчаса или больше?

1=ДА 2=НЕТ