

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
Міністерство охорони здоров'я України
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Чернобривцев Олександр Петрович

УДК 616.379-008.61:611.018.74:575

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ У РОЗВИТКУ
ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ
ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2-го ТИПУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія
222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
Чернобривцев О.П. _____

Науковий керівник: **Зяблицев Сергій Володимирович**,
доктор медичних наук, професор

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Чернобровцев О.П. Роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 «Патологічна фізіологія» – Національний медичний університет імені О.О.Богомольця МОЗ України, Київ, 2019. Інститут фізіології імені О.О.Богомольця НАН України. Київ, 2019.

Дисертацію присвячено дослідженню ролі генетичного поліморфізму (*rs1799983* гена *NOS3*, *rs1800629* гена *TNF α* , *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*) у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу (ЦД2Т).

Уточнені дані щодо перебігу та наявності ускладнень у хворих на цукровий діабет 2 типу різної тяжкості. Показано, що при середньому ступені тяжкості захворювання у хворих мала місце гіперінсулінемія та інсулінорезистентність, тоді як при важкому ступені – гіпоінсулінемія та зниження функції бета-клітин підшлункової залози. Зайва маса тіла або ожиріння були пов'язані з гіпертригліцеридемією, лептинорезистентністю і гіперлептинемією. Серед діабетичних ускладнень найчастішою була сенсорна полінейропатія (88,1 %), нефропатія (84,2 %), ретинопатія (78,3 %) та артеріальна гіпертензія (46,7 %). Вперше запропоновано оригінальний індекс тяжкості хвороби, величина якого відображала тяжкість перебігу захворювання – прямо залежала від кількості та тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта.

Вперше показаний комплексний характер взаємозв'язків зміни вмісту в крові чинників ендотеліальної дисфункції (багаторазовий приріст ендотеліну-1, стабільних метаболітів оксиду азоту, фактору некрозу пухлин- α , дієнових кон'югатів при зниженні вмісту ендотеліальної синтази оксиду азоту) та математично доведені роль ендотеліну-1 у збільшенні глікемії, альбумінурії, підвищенні ступеню декомпенсації діабету і нефропатії; вплив накопичення у крові стабільних метаболітів оксиду азоту на зниження

швидкості клубочкової фільтрації та погіршення функції нирок; вплив фактору некрозу пухлин- α і дієнових кон'югатів на всі ключові показники ЦД2Т. Представлені дані щодо впливу чинників ендотеліальної дисфункції на розвиток діабетичних ускладнень: ендотелін-1 прямо впливав на розвиток всіх ускладнень (крім макроангіопатії нижніх кінцівок); фактору некрозу пухлин - α визначав розвиток ретинопатії, нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації і артеріальної гіпертензії; накопичення у крові стабільних метаболітів оксиду азоту сприяло розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок. Вперше шляхом багатфакторної логістичної регресії побудовані адекватні моделі прогнозування ймовірності розвитку ускладнень ЦД2Т на підставні вивчених чинників ендотеліальної дисфункції та розраховані їх критичні (сигнальні) рівні у крові, які асоційовані з наявністю ускладнень.

Доведено, що в когорті українських хворих розподіл всіх вивчених поліморфізмів був пов'язаний з ЦД2Т та розвитком ускладнень ($p < 0,05$): ретинопатія визначалася генотипом *rs1800629* і *rs5351*, полінейропатія – *rs1799983* і *rs5351*, діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації – *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351*, діабетична нефропатія за рівнем альбумінурії і артеріальна гіпертензія – *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351*, макроангіопатія нижніх кінцівок – *rs1799983* і *rs1800629*. Наявність у генотипі ризикових алелей збільшувало шанси розвитку діабету, сприяло його декомпенсації та прогресуванню. Встановлені конкретні механізми такого впливу. Розраховані ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для всіх діабетичних ускладнень за наявністю того чи іншого генотипу. Розроблена математична модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за індексом тяжкості хвороби, яка включала значущі комбінації генотипів та чинників ендотеліальної дисфункції, які за питомим внеском розподілися таким чином: ендотелін-1 > стабільні метаболіти оксиду азоту > *rs5351* > *rs6842241* > *rs1799983* > фактор некрозу пухлин- α .

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, ендотеліальна дисфункція, генетичний поліморфізм, *rs1799983 NOS3*, *rs1800629 TNF α* , *rs6842241 EDNRA*, *rs5351 EDNRB*.

ANNOTATION

A.P. Chernobryvtsev. The role of genetic polymorphism in the development of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for a PhD degree in medical sciences by specialty 14.03.04 "Pathological Physiology" – O.O. Bogomolets National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2019. Bohomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the study of the role of genetic polymorphism (*rs1799983* of the gene *NOS3*, *rs1800629* of the gene *TNF α* , *rs6842241* of the gene *EDNRA* and *rs5351* of the gene *EDNRB*) in the development of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus (T2DM).

Refined data on the course and presence of complications in patients with T2DM with varying severity. It was shown that hyperinsulinemia and insulin resistance were observed in patients with moderate severity of the disease, while in severe cases hypoinsulinemia and decreased beta cell function. Excess weight or obesity has been associated with hypertriglyceridemia, resistance on leptin and hyperleptinemia. Among diabetic complications, the most frequent was sensory polyneuropathy (88.1 %), nephropathy (84.2 %), retinopathy (78.3 %) and arterial hypertension (46.7 %). The original index of severity of the disease was proposed for the first time, whose magnitude clearly reflected the degree of severity of the disease - directly dependent on the number and severity of the complications and vice versa - from the age of the patient.

The first time the complex nature of relationships changes in blood endothelial dysfunction factors (multiple growth ET1, NOx, TNF α , DC content while reducing eNOS) and mathematically proven role of ET1 in glucose increase, albuminuria, increasing the degree of decompensation diabetes and nephropathy; influence the accumulation of NOx in the blood to reduce glomerular filtration rate and worsening renal function; effect of TNF α and DC in all key indicators of T2DM.

For the first time the influence of endothelial dysfunction factors on the development of diabetic complications has been proved: ET1 directly influenced the development of all complications (except macroangiopathy of tender extremities); TNF α determined the development of retinopathy, nephropathy at the rate of glomerular filtration and arterial hypertension; NO x accumulation in the blood contributed to the development of macroangiopathy of the lower extremities. For the first time, through adequate multivariate logistic regression, adequate models for predicting the probability of development of complications of T2DM have been constructed on the basis of the studied factors of endothelial dysfunction and their critical (signaling) levels for the development of complications were calculated. It was first proved that in the cohort of Ukrainian patients the distribution of all studied polymorphisms was associated with T2DM and the development of complications ($p < 0.05$): retinopathy was determined by genotype *rs1800629* and *rs5351*, polyneuropathy - *rs1799983* and *rs5351*, diabetic nephropathy at glomerular velocity filtration - *rs1799983*, *rs1800629* and *rs5351*, diabetic nephropathy by the level of albuminuria and arterial hypertension - *rs1799983*, *rs6842241* and *rs5351*, macroangiopathy of the lower extremities - *rs1799983* and *rs1800629*. The presence in the genotype of risk alleles increased the chances of developing T2DM, contributed to the decompensation of diabetes and its progression. The specific mechanisms of such influence are established. The probabilities of development and the boundary values of the positive prediction for all diabetic complications are calculated on the presence of one or another genotype. The mathematical model for predicting the severity of T2DM mellitus according to the severity index of the disease, which included significant combinations of genotypes and endothelial dysfunction markers, were distributed according to the specific contribution as follows: ET1 > NO x > *rs5351* > *rs6842241* > *rs1799983* > TNF α .

Key words: type 2 diabetes mellitus, endothelial dysfunction, gene polymorphism, *rs1799983* NOS3, *rs1800629* TNF α , *rs6842241* EDNRA, *rs5351* EDNRB.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Зяблицев СВ, Чернобрытцев ОП, Зяблицев ДС, Стародубська ОО., Абряхімова ЦБ. Патогенетична роль ендотеліну-1 та поліморфізму його рецепторів при цукровому діабеті 2 типу. *Фізіол журн.* 2019;65(2):22-30. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
2. Chernobryvtsev O.P. The endothelial dysfunction factors in diabetes mellitus 2 type. *Journal of Education, Health and Sport.* 2019;9(1):410-6. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
3. Зяблицев СВ, Чернобрытцев ОП, Зяблицев ДС. Значення фактору некрозу пухлин альфа у механізмах розвитку нефропатії при цукровому діабеті 2 типу. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2019;65(1):72-80. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
4. Зяблицев СВ, Чернобрытцев ОП, Зяблицева МВ. Структура ускладнень цукрового діабету 2 типу у залежності від його тяжкості. *Актуальні проблеми транспортної медицини.* 2019;55(1):130-7. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
5. Зяблицев СВ, Чернобрытцев ОП, Зяблицев ДС. Поліморфізм rs1800629 гена TNF α при цукровому діабеті 2 типу. Зв'язок з розвитком нефропатії. *Международн ендокр журн.* 2019;15(1):24-30. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*

публікації).

6. Ziablitsev SV, Uzvenko TU, Chernobrivtsev OP, Grishov AA, Palamar S, Ziablitsev DS. Influence of rs1137101 gene polymorphism of leptin receptor on the development of diabetes mellitus type 2 and obesity. *Fiziol Zh.* 2018;64(6):3-8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*
7. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международ эндокр журн.* 2018;14(7):661-7. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
8. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2018;64(4):35-44. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
9. Зяблицев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Мед наука України.* 2018;1-2:34-39. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
10. Зяблицев СВ, Могилевський СЮ, Бушуева ОВ, Чернобривцев ОП. Можлива роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 при діабетичній ретинопатії і цукровому діабеті 2 типу. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2017;58(2):34-8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*

11. Зяблицев СВ, Чернобривцев ПА, Чернобривцев ОП, Антонов ЄВ. Вплив поліморфізму rs1137101 гена рецептора лептину на розвиток цукрового діабету 2-го типу. *Експ і клін мед.* 2016;71(2):86-90. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*
12. Зяблицев СВ, Ларін ОС, Новосельська ВВ, Дашук ТІ, Гаврюшенко ЛВ, Чернобривцев ОП. Управління технологічними процесами та критерії їх оцінки на етапах виконання лабораторних досліджень. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2015;49(1):55-61. *(Особистий внесок здобувача полягає у розробці критеріїв для оцінки лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

13. Zyablitsev SV, Chernobryvtsev OP. Role of Endotelin-1 and polymorphism of its receptors in type 2 diabetes mellitus and its complications. Матеріали ХХ-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка. 2019 р., м. Київ. *Фізіол журн.* 2019; 65(3):101. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*
14. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП Вплив поліморфізмів rs1799983 гена NOS3 та rs1800629 гена TNFA на розвиток ендотеліальної дисфункції у хворих на цукровий діабет 2 типу. Тези VII Пленуму Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практична конференція «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», присвячені 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка. 10-12 жовтня 2018 р., м. Полтава. Полтава, 2018:32-3. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*
15. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Гришов АА, Паламар С. Поліморфізм

генів проліфератора пероксисом гамма 2 типу (PPARG) та рецептора лептину (LEPR) обумовлюють розвиток цукрового діабету 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцького. 24-25 травня 2018 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2018:93-4. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*

16. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП. Значення ендотеліну-1 у розвитку інсулінорезистентності і ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцького. 24-25 травня 2018 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2018:97-8. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*
17. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Піщуліна МІ. Варіабельність генів VEGF, NOS3, IL-1b та TNFa при цукровому діабеті 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVI читання ім. В.В. Подвисоцького. 18-19 травня 2017 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2017:137-8. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*
18. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП. Роль поліморфізму rs1799983 гена NOS3 у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. Мат-ли конф. присвяченій 105-й річниці від дня народження професора Я.Д. Киршенבלата. 5-6 жовтня 2017 р., м. Чернівці. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2017;61(3):44. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*
19. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Борис РМ. Поліморфізм генів, що мають відношення до розвитку ендотеліальної дисфункції, при цукровому діабеті 2 типу. Тези доп. VII нац. конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції». 5-7 жовтня 2016 р., м. Харків. Харків: Вид-во НФаУ. 2016:92. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	12
ВСТУП	14
РОЗДІЛ 1. ПАТОГЕНЕЗ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2-го ТИПУ. РОЛЬ ГЕНЕТИЧНИХ ФАКТОРІВ (огляд літератури)	22
1.1. Сучасний стан проблеми цукрового діабету 2-го типу	22
1.2. Чинники, що визначають ендотеліальну дисфункцію	23
1.3. Асоціація генетичних поліморфізмів з клінічними проявами ендотеліальної дисфункції	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	37
2.1. Характеристика хворих, що прийняли участь у дослідженні..	37
2.2. Встановлення діагнозу цукрового діабету 2-го типу, наявності та ступеню ускладнень	39
2.3. Забір крові і сечі та методики лабораторних досліджень	44
2.4. Математична обробка результатів дослідження	50
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНИХ ПОКАЗНИКІВ ПО ГРУПАМ ХВОРИХ	58
3.1. Характеристика клініко-лабораторних показників, частоти та ступеню ускладнень по групах хворих	58
3.2. Структура ускладнень цукрового діабету 2-го типу у залежності від його тяжкості	74
РОЗДІЛ 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ЧИННИКІВ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ	79
4.1. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2-го типу	79
4.2. Вплив чинників ендотеліальної дисфункції на розвиток ускладнень	89
4.3. Критичні значення чинників ендотеліальної дисфункції для	

розвитку ускладнень.....	95
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ГЕНЕТИЧНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ НА РОЗВИТОК ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-го ТИПУ ТА ЙОГО УСКЛАДНЕНЬ.....	103
5.1. Зв'язок поліморфізму <i>rs1799983 (G894T, Glu298Asp)</i> гена <i>NOS3</i> з цукровим діабетом 2-го типу.....	103
5.2. Зв'язок поліморфізму <i>rs1800629</i> гена <i>TNFα</i> з цукровим діабетом 2-го типу.....	112
5.3. Зв'язок поліморфізмів рецептору ендотеліну (<i>rs6842241</i> гена <i>EDNRA</i> та <i>rs5351</i> гена <i>EDNRB</i>) з цукровим діабетом 2-го типу.....	119
РОЗДІЛ 6. ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ УСКЛАДНЕНЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-го ТИПУ ТА ЙОГО ТЯЖКОСТІ З УРАХУВАННЯМ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ТА ЧИННИКІВ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ.....	135
6.1. Прогнозування розвитку ускладнень з урахуванням генетичного поліморфізму.....	135
6.2. Прогнозування тяжкості перебігу цукрового діабету 2-го типу.....	149
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	158
ВИСНОВКИ.....	169
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	172
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	173
ДОДАТКИ.....	200

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТд	– артеріальний тиск діастолічний;
АТс	– артеріальний тиск систолічний;
ВІ	– вірогідний інтервал
ВШ	– відношення шансів
ЕДФ	– ендотеліальна дисфункція;
ІТХ	– індекс тяжкості хвороби;
РЛК	– Румпеля-Леєде-Кончаловського проба;
ЦД	– цукровий діабет
ЦД2Т	– цукровий діабет 2-го типу;
-2*log	– коефіцієнт максимальної правдоподібності (Likelihood)
AGE	– кінцеві продукти глікування
AUC	– площа під даіграмою операційної характеристики (для логістичних регресієних моделей)
<i>EDNRA</i>	– ген рецептора ендотеліну-1 А-типу
<i>EDNRB</i>	– ген рецептора ендотеліну-1 В-типу
eNOS	– ендотеліальна синтаза оксиду азоту;
ET1	– ендотелін-1;
ETa	– рецептор ендотеліну-1 А-типу
ETb	– рецептор ендотеліну-1 В-типу
f	– частота (у таблицях);
F	– критерій Фишера
Fet2	– двосторонній точний метод Фішера
H	– критерій теста Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks
HbA1c	– глікований гемоглобін;
НОМА-ІР	– індекс інсулінорезистентності
НОМА-ФБК	– індекс функціонування бетта-клітин
IL	– інтерлейкіни
iNOS	– індукцйбельна синтаза оксиду азоту
MAPK	– мітоген-активована протеїнкіназа
Me	– медіана варіційного ряду

n	– кількість спостережень (у таблицях);
NADP	– нікотинамід-аденин-дінуклеотид-фосфат
NO	– оксид азоту;
NO _x	– стабільні метаболіти оксиду азоту (нітрити і нітрати)
NOS3	– ген ендотеліальної синтази оксида азоту
O ₂ ⁻	– супероксиданіон
p	– вірогідність відмінностей від нульової гіпотези;
P _(АГ)	– ймовірність артеріальної гіпертензії
P _(МАНК)	– ймовірність макроангіопатії нижніх кінцівок
P _(НП АУ)	– ймовірність нефропатії за альбумінурією
P _(НП ШКФ)	– ймовірність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації
P _(ПНП)	– ймовірність полінейропатії
P _(РП)	– ймовірність ретинопатії
PAI-1	– інгібітор активатора плазміногену
PI3K	– фосфоінозитид-3-кіназа
PKC	– протеїнкіназа-С
Q1, Q3	– 1-й і 3-й квартилі вараційного ряду
QUICKI	– індекс чутливості до інсуліну
R	– коефіцієнт множинної кореляції
R ²	– коефіцієнт детермінації
RNS	– активні форми азоту
ROC	– діаграма операційної характеристики (для логістичних регресійних моделей)
ROS	– активні форми кисню
t	– критерій Стюдента
TNF α	– фактор некрозу пухлин- α
TNF α	– ген фактора некрозу пухлин- α
U	– критерій Mann-Whitney
Wald	– критерій Wald - статистики
$\beta \pm SE$	– коефіцієнт регресії і його стандартна похибка;
χ^2	– критерій хі-квадрат Пірсона

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Цукровий діабет 2-го типу (ЦД2Т) розглядають як пандемію ХХІ сторіччя [40,49]. Згідно Міжнародної федерації діабету поширеність діабету складає понад 360 мільйонів, але за прогнозами експертів до 2030 року кількість хворих збільшиться майже вдвічі. При ЦД2Т інвалідизація хворих внаслідок розвитку діабетичних ускладнень розвивається в короткі строки [32]. Найбільш поширеними ускладненнями діабету є судинні (макро- та мікроангіопатії), а тяжкість захворювання зв'язана саме з їх наявністю: легкий перебіг визначається при відсутності макро- і мікросудинних ускладнень та полінейропатії; середня ступінь тяжкості – при наявності ретинопатії 1-го ступеню, нефропатії 1-го ступеню та полінейропатії; важкий перебіг – при наявності ретинопатії 2-го або 3-го ступенів, нефропатії 3-го ступеню та за наявності макроангіопатії [39,124].

З'ясування ролі судинного ендотелію розвивалося протягом останніх двох десятиліть та дійшло до розуміння того, що він є динамічною регулюючою системою та відіграє ключову роль як у фізіологічних, так при патологічних процесах [59,192]. Ендотеліальні клітини виконують бар'єрну роль та активно регулюють тонус судин, кровообіг і функцію тромбоцитів [71,78]. При ЦД2Т цілий каскад патологічних реакцій розгортається в ендотелії судин, які потрапляють від глюкозотоксичності, надмірної дії стимулюючих гіпертензивних та запальних факторів, активаторів тромбоутворення, інтенсифікації окисного стресу [53,199]. До розвитку ендотеліальної дисфункції (ЕДФ) призводять такі чинники: 1) підвищений окислювальний стрес і системне запалення; 2) деградація і проліферація глікокаліксу; 3) порушення міжклітинних контактів ендотеліоцитів та гемато-тканинного бар'єру; 4) посилення адгезії лейкоцитів і екстравазація; 5) індукція прокоагулянтів і антифібрінолітичних систем [58]. Пошкоджений ендотелій включається в патогенез ЦД2Т і обумовлює розвиток подальших порушень [192]. Основними чинниками ЕДФ є гормон ендотелію – ендотелін

(ET1), оксид азоту (NO), ендотеліальна NO-синтаза (eNOS), а також фактор некрозу пухлин (TNF α) і маркер окісного стресу – дієнові кон'югати (ДК), які накопичуються у крові та викликають ЕДФ [148,194].

Останніми дослідженнями показана важлива роль генетичних факторів, які відіграють роль чинників, що сприяють виникненню ЦД2Т: розроблено генетичний атлас, який був складений шляхом інтегративного аналізу 650 генів і 34 мікроРНК генів, пов'язаних з цим захворюванням та його ускладненнями, з використанням бази Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) [200]. У цьому плані привернув увагу поліморфізм *rs1799983* (*G894T*, *Glu298Asp*) гена *NOS3*, мінорний алель *T* якого асоційований із зниженням активності eNOS [207]. Чисельні літературні дані, а також аналіз власних досліджень (вісім досліджень з поліморфізмом *rs1799983* гена *NOS3* і чотири мета-аналізи; загалом 4795 випадків та 3805 контролів) дозволили О. Tabatabaei-Malazy et al. (2017) доказово довести зв'язок цього поліморфізму з ЦД2Т [223].

У чисельних дослідженнях [128,134,178,214] показана наявність асоціації поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* з розвитком ЦД2Т та його ускладненнями. Системний огляд публікацій з 2000 по 2016 роки, зроблений G.I. Luna et al. (2016) звернув увагу на відмінності результатів визначення впливу цього поліморфізму у різних популяціях, що, на думку авторів, пов'язане з етнічними розходженнями та диктує необхідність таких досліджень у кожній популяції окремо [162]. Результати дослідження W. Li et al. (2018) переконливо показали, що ЕДФ та система ET1 і його рецепторів бере активну участь у розвитку діабетичних судинних ускладнень [156]. При ЦД2Т визначена підвищена експресія ET1 і його рецепторів А типу (ET α), що відповідало ступеню нефропатії [249]. Доведена наявність зв'язку поліморфізмів гена *EDNRB* з розвитком діабетичної ретинопатії [64].

Нажаль, конкретні механізми розвитку ЕДФ та її патогенетичні чинники висвітлені недостатньо, не ясно чому у одному випадку у хворого прогресує ретинопатія, а у другому, в такого ж за клініко-лабораторними

показниками хворого, прогресує нефропатія [40].

Таким чином, дослідження ролі генетичного поліморфізму у розвитку ЕДФ при ЦД2Т, яке включає комплексну оцінку тяжкості та ускладнень захворювання, оцінку значення чинників ЕДФ та генетичних факторів є своєчасним та актуальним науковим завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патофізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Роль генетичних поліморфізмів у патогенезі метаболічних порушень при цукровому діабеті 2 типу», № держреєстрації 0115U005799 та прикладної науково-дослідної роботи МОЗ України «Вивчити значення генетичних чинників та зовнішніх впливів у розвитку і прогресуванні мікроциркуляторних ускладнень при цукровому діабеті 2 типу», № держреєстрації 0118U001214. Дисертант є співвиконавцем цих робіт.

Мета і завдання дослідження

Метою дослідження було встановлення ролі генетичних поліморфізмів (*rs1799983* гена *NOS3*, *rs1800629* гена *TNF α* , *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*) у розвитку ЕДФ при ЦД2Т.

Для досягнення мети необхідно було вирішити окремі **завдання**:

1. Вивчити клініко-лабораторні показники перебігу ЦД2Т у групах хворих, виділених згідно до тяжкості захворювання.
2. Вивчити частоту та ступень діабетичних ускладнень (ретинопатії полінейропатії, нефропатії, макроангіопатія нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії) по групах хворих; розробити інтегральний індекс оцінки тяжкості перебігу хвороби.
3. Вивчити вміст у крові чинників ЕДФ (ET1, NO, eNOS, TNF α та ДК) по групам хворих; проаналізувати їх вплив на клініко-лабораторні показники перебігу захворювання та вплив на розвиток діабетичних ускладнень; шляхом багатофакторної логістичної регресії побудувати моделі прогнозування розвитку ускладнень.

4. Визначити розподіл частот алелей і генотипів *rs1799983* гена *NOS3* і ступінь їх зв'язку з розвитком захворювання, показниками його перебігу та розвитком діабетичних ускладнень.
5. Визначити розподіл частот алелей і генотипів *rs1800629* гена *TNFα* і ступінь їх зв'язку з розвитком захворювання, показниками його перебігу та розвитком діабетичних ускладнень.
6. Визначити розподіл частот алелей і генотипів генів ендотелінових рецепторів (*rs6842241* гена *EDNRA* та *rs5351* гена *EDNRB*) і ступінь їх зв'язку з розвитком захворювання, показниками його перебігу та розвитком діабетичних ускладнень.
7. Розраховувати ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для діабетичних ускладнень в залежності від генотипів вивчених поліморфізмів; розробити математичну модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за індексом тяжкості хвороби з урахуванням поліморфних генотипів та чинників ЕДФ.

Об'єкт дослідження – ендотеліальна дисфункція при ЦД2Т.

Предмет дослідження – поліморфізм генів, що регулюють функцію ендотелію (*rs1799983* гена *NOS3*, *rs1800629* гена *TNFα*, *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*); вміст у крові чинників ЕДФ (ЕТ1, NO, eNOS, TNFα та ДК); клініко-лабораторні показники перебігу ЦД2Т та його ускладнень.

Методи дослідження

Клінічні (загальне клінічне обстеження хворих), біохімічні (вміст у крові стабільних метаболітів NO (NOx), ДК, глюкози, глікованого гемоглобіну (HbA1c), сечовини, креатиніну, холестерину, ліпопротеїнів низької щільності, тригліцеридів), імуноферментні (вміст у крові ЕТ1, eNOS, TNFα, інсуліну і лептину та альбуміну в сечі), молекулярно-генетичні (визначення поліморфізмів *rs1799983* гена *NOS3*, *rs1800629* гена *TNFα*, *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*); математичні (варіаційний, непараметричний, одно- и багатофакторний регресійний аналізи).

Наукова новизна одержаних результатів

Доповнено та уточнено дані щодо перебігу захворювання та наявності ускладнень у хворих на ЦД2Т різних ступенів тяжкості. Показано, що при середньому ступені тяжкості захворювання у хворих спостерігалась гіперінсулінемія та інсулінорезистентність, тоді як при важкому ступені – гіпоінсулінемія та зниження функції бета-клітин підшлункової залози. Зайва маса тіла або ожиріння були пов'язані з тригліцеридемією, лептинорезистентністю і гіперлептинемією. Вперше запропоновано оригінальний індекс тяжкості хвороби (ІТХ), величина якого відображала тяжкість перебігу захворювання – прямо залежала від кількості та тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта.

Вперше показано взаємопов'язані зміни вмісту в крові чинників ЕДФ (багаторазовий приріст ET1, NOx, TNF α , ДК при зниженні вмісту eNOS) та математично доведено роль окремих чинників ЕДФ у формуванні ключових порушень клініко-лабораторних показників ЦД2Т. Уточнено дані, щодо впливу чинників ЕДФ на розвиток окремих діабетичних ускладнень, та розраховано їх критичні (сигнальні) рівні у крові, асоційовані з наявністю ускладнень.

Вперше доведено, що в когорті українських хворих розподіл поліморфних алелей вивчених генів впливав на наявність ЦД2Т. Показано, що наявність у пацієнтів мінорного алеля *T rs1799983* гена *NOS3*; мінорного алеля *A rs1800629* гена *TNF α* ; мінорного алеля *A rs6842241* гена *EDNRA* і предкового алеля *C rs5351* гена *EDNRB* збільшувало шанси розвитку діабету, сприяло його декомпенсації та прогресуванню. Встановлено, що певні поєднання ризикових алелей у генотипі пацієнтів впливали на вміст у крові чинників ЕДФ та визначали характер і тяжкість діабетичних ускладнень. Розраховано ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для діабетичних ускладнень за наявністю того чи іншого генотипу.

Практичне значення одержаних результатів

Побудовано багатofакторні регресійні моделі прогнозування

ймовірності розвитку діабетичних ускладнень за генотипом: ретинопатія визначалась генотипом *rs1800629* і *rs5351*, полінейропатія – *rs1799983* і *rs5351*, діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації – *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351*, діабетична нефропатія за рівнем альбумінурії і артеріальна гіпертензія – *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351*, макроангіопатія нижніх кінцівок – *rs1799983* і *rs1800629*.

Розроблено математичну модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за ІТХ, яка включала значущі комбінації генотипів та маркери ЕДФ. За питомим внеском ці фактори розподілись таким чином: $ET1 > NOx > rs5351 > rs6842241 > rs1799983 > TNF\alpha$. Прогресування діабету, розраховане за прогнозом, розцінювалось як повільне при ІТХ менше за 2,7 ум.од., помірне – 2,7-7,0 ум.од. і швидке – 7,1-11,3 ум.од.

Побудовано моделі прогнозування розвитку ускладнень в залежності від вмісту маркерів ЕДФ: для ретинопатії мали значення рівні $ET1$ і $TNF\alpha$; для макроангіопатії нижніх кінцівок – NOx і $TNF\alpha$; для полінейропатії – $ET1$; для нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації – $ET1$ і $TNF\alpha$; для нефропатії за альбумінурією – $ET1$ і $eNOS$; для артеріальної гіпертензії – $ET1$, NOx і $TNF\alpha$).

Розраховано критичні рівні у крові маркерів ЕДФ: вміст $ET1$ вищий за 1,990 фмоль/мл підтверджував розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, а вище за 2,309 фмоль/мл – інших ускладнень. Збільшення вмісту у крові $TNF\alpha$ вище за 102,0 пг/мл і 105,1 пг/мл характеризувало розвиток ретинопатії та нефропатії, відповідно. Розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, крім $ET1$, підтверджувало зменшення вмісту у крові $eNOS$ нижче за 250,4 пг/мл та ДК нижче за 5,368 Од./мл.

Результати роботи впроваджено в науковий процес Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України; учбовий процес на кафедрах патофізіології в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України, Одеському національному медичному університеті МОЗ України, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України,

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Горбачевського» МОЗ України, Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України, Харківському національному медичному університеті МОЗ України, Медичному інституті Сумського державного університету МОН України, Івано-Франківському національному медичному університеті МОЗ України та на кафедрі патологічної та топографічної анатомії Національній академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України.

Особистий внесок здобувача

Визначення мети і завдань дослідження, узагальнення отриманих результатів і висновків здійснено автором роботи разом із науковим керівником. Участь здобувача в отриманні результатів дослідження є основною і полягає в розробці наукової концепції дисертації, аналізі літературних джерел за темою, реалізації патентного пошуку. Самостійно проведено обстеження хворих та лабораторну частину роботи на базі НДІ експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України (директор – д.мед.н., проф. Л.В. Натрус). Автор самостійно провів математичний аналіз отриманих цифрових результатів дослідження. Дисертантом не було використано результати та ідеї співавторів публікацій, що не входять до спільних робіт.

Апробація результатів дисертації

Дисертаційну роботу апробовано на апробаційному семінарі з теоретичних дисциплін НМУ імені О. О. Богомольця МОЗ України (15 квітня 2019 р.). Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені і обговорені на: VII національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (5-7 жовтня 2016 р., м. Харків); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції», присвяченій 105-й річниці від дня народження професора Я.Д. Киршенבלата (5-6 жовтня 2017 р., м. Чернівці); XVI та XVII читаннях імені В.В. Подвисоцького (2017, 2018 рр., м. Одеса); VII Пленумі Українського

наукового товариства патофізіологів «Інтегративні механізми патологічних процесів» (10-12 жовтня, 2018 р., м. Полтава); XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (2019 р., м. Київ).

Публікації

За темою дисертації опубліковано 19 наукових праць, серед яких 12 робіт у журналах, рекомендованих МОН України, 7 – в матеріалах наукових форумів.

Обсяг і структура дисертації

Дисертацію викладено українською мовою на 214 сторінках тексту, що включає в себе вступ, 7 розділів (у тому числі огляд літератури, опис матеріалів і методів, 4 розділів опису результатів власних досліджень, узагальнення й аналіз отриманих результатів), висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел літератури, що містить 254 найменування (50 кирилицею і 204 латиницею). Роботу ілюстровано 65 таблицями та 36 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ПАТОГЕНЕЗ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2-го ТИПУ. РОЛЬ ГЕНЕТИЧНИХ ФАКТОРІВ

(огляд літератури)

1.1. Сучасний стан проблеми цукрового діабету 2-го типу

Цукровий діабет (ЦД) – багатфакторне захворювання, яке характеризується гіперглікемією, порушенням вироблення інсуліну, розвитком ускладнень та також має виражений епідемічний характер поширення.[83,190]. Згідно дослідженням International Diabetes Federation (IDF) у 2017 р. в світі було зареєстровано понад 425 млн хворих на ЦД. Прогнозується зростання їх кількості к 2045 р. на 48 % до 629 млн. хворих. [124,126]. Проблема ЦД пов'язана не тільки з широким розповсюдженням захворювання, але і з високою смертністю. У 2017 году близько 4 млн. померлих в світі було пов'язано безпосередньо з ЦД. Проблему ЦД робить ще більш актуальною високий відсоток недіагностованого діабету, який становить від 30 % до 80 % від дійсно хворих [99].

У Європі в 2017 р. було зареєстровано 58 млн. пацієнтів, хворих на ЦД, включаючи недіагностовані випадки (22 млн.). Померло від діабету в Європейському регіоні понад 477 тис. хворих. К 2045 р. прогнозується зростання загальної кількості хворих на 16 % до 67 млн. [124]. Схожа тенденція спостерігається і в Україні. В 2017 р. зареєстровано 2 млн. 836 тис. хворих. З недіагностованим діабетом – 1 млн. 153 тис. Кількість випадків смерті від діабету – 41,5 тис.

Найбільш часто зустрічається ЦД2Т, поширеність якого сягає 90 % від загального числа хворих на діабет [67,95,116]. Для ЦД2Т, крім порушень пов'язаних з секрецією інсуліну, характерним є феномен інсулінорезистентності та прихований перебіг з тривалим періодом уявного

благополуччя, коли захворювання буває недіагностованим [51].

В Україні поширеність ЦД2Т становить понад 85 % від загальної кількості хворих на ЦД. При цьому його фактична поширеність може перевищувати статистичну більш ніж в 2 рази [32,49,48,124].

Клінічні прояви ускладнень, які змушують пацієнтів, хворих на ЦД2Т звернутися в лікувальні установи, як правило, пов'язані зі стійкою хронічною гіперглікемією і носять важкі медичні та соціальні наслідки [150,164,243]. На момент діагностики справжня тривалість захворювання може становити 7-12 років. У цей час маніфестують клінічні прояви пов'язані з мікросудинними [57,172] і макросудинними [56,70,77,185] ускладненнями.

Мікросудинні ускладнення включають: ретинопатію, яка супроводжує перебіг захворювання у 26-35% хворих [125,247]; нефропатію – у 20-40 % хворих [43,75,82,96,172]; полінейропатію – у 16-66 % хворих [2,31,62,63,250]. Макросудинні ускладнення пов'язані з атеросклеротичним пошкодженням коронарних, мозкових і периферичних судин і зустрічаються у 12-32 % хворих [94,188]. Завдяки тривалому стажу неконтрольованої гіперглікемії ускладнення ЦД2Т характеризуються важким перебігом, високим ризиком інвалідності та передчасною смертністю [1,39,124].

Розвиток ускладнень тісно пов'язаний з основними факторами ЦД2Т, такими як гіперглікемія, інсулінорезистентність та оксидативний стрес. У той же час провідну роль в патогенезі судинних ускладнень відіграють порушення функції ендотелію – ендотеліальна дисфункція [29,44,54,85,112].

1.2. Чинники, що визначають ендотеліальну дисфункцію

Ендотелій – біологічно активний моноцитарний шар на кордоні крові і судинної стінки [221], який виконує безліч функцій, включаючи регуляцію тону судинної стінки, їх проникності, реологічних властивостей крові і гемостазу, клітинної адгезії, проліферації клітин судин, активації тромбоцитів, фібринолізу і запальних реакцій [61,97,98,174]. Свою функцію

ендотелій виконує завдяки продукції низки регуляторних медіаторів: NO, ET1, простаноідів - (простацикліну і тромбоксану, ангіотензину II, тканинному активатору плазміногену (t-PA), інгібітору активатора плазміногену (PAI-1), фактору von Willebrand (vWF), молекулам адгезії (ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин, Р-селектин та ін.), цитокінам (інтерлекіни (IL) 1, 6, 4, 10, TNF α та ін.), активним формам кисню (ROS) та азоту (RNS), які мають однонаправлені або різноспрямовані ефекти [8,33,97,133, 151,198,212,213,222].

Основні механізми регуляції судинного тонуусу в фізіологічних умовах і при ЕДФ зображені на рис. 1.1 (за основу використані малюнки [146,186] з доповненнями).

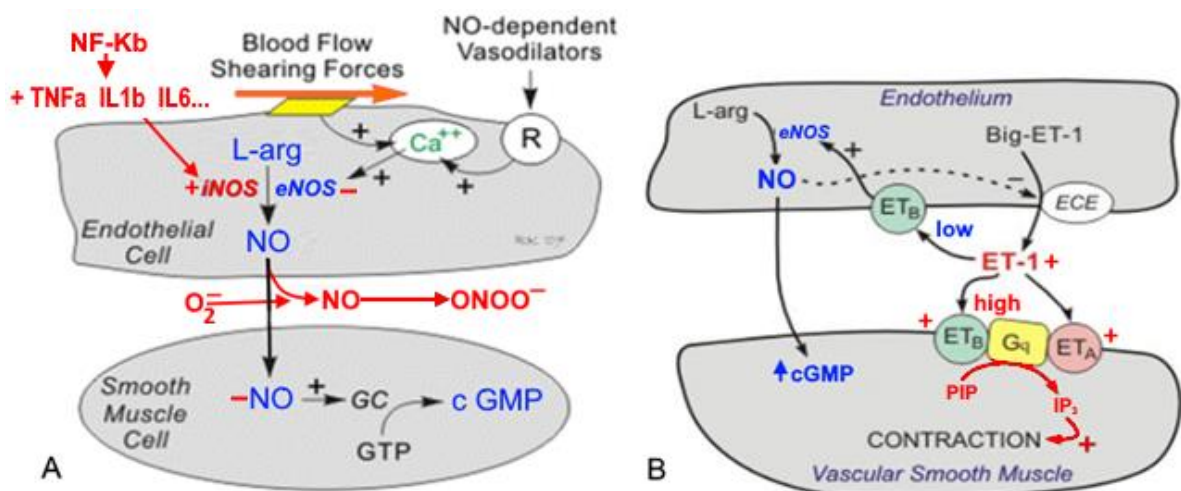


Рис. 1.1. Регуляція судинного тонуусу системами оксиду азоту (А) і ендотеліну-1 (В).

Блакитним кольором зображені основні медіатори ендотеліальної функції, що відіграють провідну роль у регуляції судинного тонуусу в фізіологічних умовах, червоним – при ЕДФ в умовах патології.

Функція ендотелію у фізіологічному стані пов'язана з продукуванням NO і простацикліну і спрямована на зниження судинного тонуусу, обмеження запальних реакцій за рахунок зниження адгезії лейкоцитів, збереження адекватної проникності судин для макромолекул і клітин крові, інгібування

адгезії і агрегації тромбоцитів, а також – на обмеження активації коагуляційних механізмів в каскадах взаємодій тромбомодулін/протеїн С, гепарин/антитромбін і плазміноген/плазмін та регуляцію фібринолізу за рахунок синтезу t-PA і PAI-1 [45,129,137,143].

Ендотеліальна клітина конститутивно продукує NO з L-аргініну за рахунок ферменту eNOS, яка локалізована на клітинній мембрані і залежить від кальцію і кальмодуліну в присутності кисню, кофакторів: нікотинамід-аденин-дінуклеотид-фосфату (NADPH); 5,6,7,8-тетрагідробіоптерину (BH₄); флавінмононуклеотиду/флавінаденіндинуклеотиду і глутатіону [120,183]. Регуляція активності eNOS здійснюється за рахунок напруги зсуву ендотелію, генерованого кровотоком і дії на ендотеліальні рецептори таких лігандів, як ацетилхолін, брадикінін, серотонін, речовина P, аденозин тощо [50,118,230,237].

NO, який утворюється таким чином в пікомолярних концентраціях, є ліпофільною молекулою і легко дифундує через клітинні мембрани у міоцити, де зв'язується гуанілатциклазою з утворенням циклічного гуанозінмонофосфату (cGMP), який опосередковує свій месенжерний ефект за допомогою специфічної протеїнкінази, викликаючи зниження рівня вільного Ca²⁺ у міоцитах, що ініціює судинну дилатацію. Незв'язаний з гуанілатциклазою надлишок NO після дифузії у кровотік інактивується гемоглобіном та/або вступає у реакцію з супероксиданіоном (O₂⁻). Останні реакції у фізіологічних умовах протікають з малою інтенсивністю і не здатні викликати цитотоксичний ефект RNS [35,36].

Патогенетичні фактори ЦД2Т пригнічують активність eNOS. У той же час, такі агенти, як медіатори запалення, ендотоксини, цитокіни, гіпоксія, гіперглікемія та інші експресують транскрипцію індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS), яка локалізована у ендотелії і є незалежною від кальцію розчинною ізоформою ферменту. Її активність в нормальних умовах практично не визначається [101,102,106,135,158,224].

Кількість NO, що утворюється під впливом iNOS, може досягати

наномолярних значень. Встановлено, що ця фракція NO відіграє вирішальну роль в утворенні RNS - цитотоксичного пероксинітриту, вступаючи в реакцію з O_2^- . Джерелом підвищеної концентрації O_2^- є мітохондрії. Патологічні умови викликають порушення функціонування ферментів дихального ланцюга мітохондрій і за участю ксантиноксидази або NADP-оксидази створюють умови для утворення компонентів ROS [66,76,91,123]. Надлишкові кількості O_2^- здатні вступати в реакцію з NO, що перешкоджає його дифузії в клітини гладеньких м'язів судин і тим самим обмежує його фізіологічний ефект. Вважають, що втрата біодоступності NO на тлі підвищеної продукції RNS та зниження біосинтезу ендотеліальної фракції газу, є ключовими ланками патогенезу ЕДФ [114].

Ще однією важливою ланкою ЕДФ є наявність дисбалансу між регуляторними системами ендотелію. У патологічних умовах переважають вазоконстрикторні чинники, такі як ET1, ангіотензин II, і тромбоксан, що призводить до розвитку судинного спазму, активації тромбоцитів, адгезії лейкоцитів, порушення коагуляції, запальних реакцій судинної стінки, прискоренню атеросклеротичних процесів та тромбоутворення [232].

Найважливіший з них – ET1, є поліпептидом з 21 амінокислотного залишку, молекулярної масою 2492 Д. ET1 утворюється з великого ET1 (39 амінокислотних залишків) поблизу мембран ендотеліальних клітин за участю ендотелін-конвертуючого ферменту (ECE). Великий ET1 виробляється ендотелієм з попередника – препроендотеліна шляхом відщеплення олігопептидних фрагментів. До факторів, які експресують каскад реакцій утворення ET1 відносяться гіпоксія, ішемія, стрес [211,241]. Такі медіатори, як адреналін, вазопресин, ангіотензин II, тромбін, цитокіни, ROS, а також сила напруги зсуву ендотелію, також стимулюють синтез ET1. Інгібіторами утворення ET1 є NO, простагліцин, натрійуретичний пептид та ін. [80,140,241].

ET1 реалізує свої ефекти через два види рецепторів: типу A (ET_A) і типу B (ET_B). Обидва рецептори локалізовані на мембранах гладких м'язів

судин, пов'язані з Gq-протеїном, який діє через активацію фосфоліпази C. Остання гідролізує фосфатидилінозитол (PIP2) з утворенням вторинних месенджерів інозитолтрифосфату (IP3) і діацилгліцерола (DAG). Ці медіатори модулюють кальцієві канали ендоплазматичного ретикулуму і протеїн C і регулюють вивільнення Ca^{2+} в цитоплазму клітин, що призводить до скорочення м'язових волокон. Встановлено, що ET β крім міоцитів судинної стінки також експресується на мембранах ендотеліальних клітин. Його функція опосередковується через активізацію NOS3 і збільшення ендотеліальної продукції NO, що викликає вазодилатацію [86,103,127,170,184,219].

Відмінності в локалізації рецепторів ET1 обумовлюють диференційовану відповідь, яка залежить від концентрації ET1. Невисока концентрація реалізує релаксацію судин паракринним шляхом через вплив на ET β . Висока концентрація активує рецептори ET α і ET β на клітинах гладеньких м'язів, і, як результат, призводить до судинного спазму [202]. Як правило патологічні стани супроводжуються активацією синтезу ET1 з переважанням реакцій вазоконстрикції, порушенням мікроциркуляції і активізацією всіх фаз тромбоутворення [226]. Важливою властивістю ET1 є стимуляція прозапальних ефектів у судинах шляхом експресії молекул адгезії судинних клітин (VCAM1) і міжклітинної адгезії (ICAM1), а також циклооксігенази-2 [179].

Активізація прозапальних ефектів ендотелію є ще однією важливою ланкою ЕДФ і тісним чином пов'язана з виробкою цитокінів, провідну роль серед яких грає TNF α [7,163,211]. Разом з IL1 β і IL6 TNF α відноситься до прозапальних медіаторів і є пептидом з молекулярної масою 18 кД, який утворюється в моноцитах, макрофагах, ендотеліоцитах і гладеньких м'язових клітинах та має цитотоксичну активність. При ЕДФ TNF α активізує макрофаги, підсилює міграцію лейкоцитів, експресує молекули адгезії і синтез простагландинів та IL6, активує ROS [130,216]. Найважливішим патологічним ефектом TNF α є здатність стимулювати iNOS, викликаючи при

цьому надлишковий синтез NO з подальшим утворенням цитотоксичних компонентів RNS [147,149,175].

У фізіологічних умовах глюкоза метаболізується в основному через гліколіз. Збільшення внутрішньоклітинної концентрації глюкози призводить до активації наступних патологічних шляхів, що ведуть до пошкодження ендотелію: поліолового (активізація альдоредуктази і сорбітолдегідрогенази з утворенням цитотоксичного сорбітолу); гексозамінового (утилізація фруктозаміну-6-фосфату до уридин-діфосфат-N-ацетилглюкозамін з модуляцією транскрипційного фактора NF- κ B); синтезу протеїнкінази-C (PKC); утворенню кінцевих продуктів глікування (AGE) [28,26,27,66].

Гіперглікемія також призводить до збільшення мітохондріальної продукції ROS шляхом PKC-активації NADP-залежної оксидази [65,238]. Модуляція NF- κ B на тлі гіперглікемії, опосередковує запальні реакції судин, збільшуючи продукцію цитокінів, молекул адгезії і активуючи макрофаги в стінці судин [6,66,77,79]. До тих же ефектів призводить утворення AGE з подальшим їх рецепторним зв'язуванням рецепторами до AGE (RAGE) [72,197]. Крім того, AGE знижують експресію eNOS і синтез NO і підвищують експресію ET1 [244]. S. Xu et al. (2016) встановили, що більш шкідливу дію мають високі коливання рівнів глюкози, ніж постійна гіперглікемія [245].

Ключовою особливістю ЦД2Т є інсулінорезистентність, яка характеризується зниженням здатності інсуліну стимулювати засвоєння глюкози [201,209]. Інсулінорезистентність, як правило, виникає за кілька років до клінічних проявів гіперглікемії та діабету [193]. Сигнальні шляхи інсуліну включають фосфоінозитид-3-кіназний (PI3K) шлях, відповідальний за метаболічні ефекти інсуліну та мітоген-активованій протеїнкіназний (MAPK) шлях, який використовується для регуляції експресії генів, диференціювання і зростання клітин. Через PI3K-залежний шлях інсулін стимулює eNOS і утворення NO. MAPK – залежний шлях впливає на секрецію ET1 [55,181]. Інсулінорезистентність викликає порушення PI3K-

залежного сигнального шляху інсуліну і активує MAPK-залежний шлях, що призводить до зниження продукції ендотеліальної фракції NO і стимуляції утворення ET1 [145].

Інсулінорезистентність збільшує експресію PAI-1 і молекул адгезії [177], стимулює проліферацію клітин гладких м'язів судин, сприяє значному виділенню вільних жирних кислот у жировій тканині з наступною активацією PKC, NADP-залежної оксидази і виробленням ROS [123]. Збільшення сироваткового вмісту PAI-1, ET1, TNF α , IL6, С-реактивного протеїну пов'язані із запальною складовою патогенезу ЕДФ [182]. Н. Westergren et al. (2016) встановили зв'язок розрахункового індексу інсулінорезистентності (НОМА-IP) з ЕДФ і можливість використання даного показника як прогностичного у пацієнтів без клінічних проявів діабету [240].

ЦД2Т супроводжується підвищенням виділенням вільних жирних кислот з жирової тканини і зниженням поглинанням їх у м'язах [88,138]. Надмірна концентрація FFA збільшує експресію NADP-залежної оксидази та викликає роз'єднання окисного фосфорилування у мітохондріях зі збільшенням вироблення ROS [66,123]. Останні викликають зниження активності таких ферментів, як eNOS і PGI $_2$ -синтаза, виснажують внутрішньоклітинний пул природного антиоксиданту глутатіону, експресують NF-kB, викликаючи активацію запальних реакцій [60,107,132]. Так само було встановлено, що вільні жирні кислоти здатні активувати PKC і IKK α с подальшим порушенням PI3K- залежних реакцій інсуліну з гальмуванням eNOS-опосередкованої продукції NO [144,180,236]. Вільні жирні кислоти підсилюють вироблення ROS, знижують синтез і біодоступність NO і підсилюють запальну реакцію в судинах [251].

Інсулінорезистентність збільшує приплив вільних жирних кислот з вісцеральних адипоцитів в ендотеліальні клітини артерій та активують в них метаболічні ушкодження і окислювальний стрес, що пояснює зв'язок між інсулінорезистентністю та макросудинними ускладненнями. [66,69].

Встановлено [65,165,238], що збільшення продукції ROS/RNS,

пов'язаних с гіперглікемією, в свою чергу, викликають, в основному, мікросудинні ускладнення. У будь-якому варіанті окислювальний і нітрозативний стреси можуть вважатися загальними механізмами формування судинних ушкоджень [89,109].

Дослідження М. Kalani et al. (2008) виявили прямий кореляційний зв'язок між ступенем розвитку мікроангіопатії при ЦД2Т та концентрацією ET1 у крові [136]. Останнім часом ряд досліджень показав роль факторів росту і пептидів, таких як ангіотензин II, в експресії ET1 при гіперглікемії [73,195,208], а також – підвищений рівень експресії рецепторів до ендотеліну ETa і ETb [100,111,210].

Як було показано вище, ендотелій при діабеті посилено продукує ROS. У фізіологічних умовах ROS виступають у якості сигнальних молекул, які беруть участь в регуляції основних клітинних функцій. Підвищені концентрації ROS викликають клітинне пошкодження і смерть клітини [109]. Ендотелій судин, як активно-функціонуюча структура, є головною метою для компонентів окисного стресу. Це пов'язано з порушеннями в передачі внутрішньоклітинних і міжклітинних сигналів редокс-регульованими факторами транскрипції [115,155]. Вважають, що депресія ендотелій-залежної вазодилатації у пацієнтів з діабетом насамперед пов'язана із зниженням біодоступності NO через його зв'язування компонентами ROS, а зниження активності eNOS та синтезу опосередкованої нею фракцією NO, обумовлено розвитком ЕДФ мікросудинного русла [167].

Встановлено, що окислювальний стрес є одним з ранніх механізмів пошкодження ендотелію [149,159,228,234]. У той же час опубліковані дані, що свідчать про малу значимість окисного стресу, як патогенетичного фактора ЦД2Т у людини [117,121,171,189]. Пізніше в дослідженні А.О. Odegaard et al. (2016) був підтверджений кореляційний зв'язок біомаркерів окисного стресу (окислені ліпопротеїди низької щільності і ізопростан-F₂) з ЦД2Т [187]. Окислювальний стрес в умовах глюколіпотоксичності викликає реакції вільного радикального перекісного

окислення ліпідів [220] з накопиченням первинних – дієнових кон'югатів і вторинних – малоновий діальдегід та ін. продуктів вільнорадикального розщеплення фосфоліпідів [191].

Порушення рівноваги між антиоксидантними та прооксидантними системами клітини при ЦД2Т призводить до виснаження антиоксидантної резерву клітин, однією з причиною якого є високе вільно-радикальне навантаження, що обумовлено процесами глікування білків з утворенням AGE [141]. Було встановлено, що глікування білків майже в 50 разів збільшують швидкість утворення вільних радикалів і більш ніж у 2 рази пришвидшують прискісне окислення ліпідів у клітинній мембрані [176]. Взаємодія AGE зі своїми рецепторами веде до збільшеного утворення тромбомодуліну та активує клітинні рецептори для прозапальних цитокінів й факторів росту, що призводить до інтенсифікації запальних реакцій з посиленням міграції і проліферації гладком'язових клітин [161,196,235].

Процес зв'язування NO супероксиданіоном з утворенням RNS відображає маргінальну цитотоксичну сутність вільно-радикальних реакцій, які лежать в основі нітрозативно-окисного стресу. У результаті цих реакцій NO втрачає свою біологічну активність і антипроліферативні властивості та стає джерелом цитотоксичності. Пероксінітрит та інші RNS викликають клітинні пошкодження за рахунок нітрування клітинних протеїнів, порушення функції трансмембранних каналів і пошкодження ДНК [122]. Деструкція ДНК стимулює ядерний фермент полі(АДФ-рибози)-полімераза (PARP), яка споживає при своєму функціонуванні NADH, й, тим самим, викликає гальмування NAD-залежних процесів: транспортного ланцюга електронів, утворення АТФ, гліколізу (за рахунок блокування ключового ферменту – глицеральдегід-3-фосфат дегідрогенази) [91,233].

Роботи останніх років підтверджують теорію участі мітохондрій, які знаходяться у стані так званої мітохондріальної дисфункції у виробленні компонентів ROS і RNS, переважно O_2^- . S. Rovira-Llopis et al. (2017) вважають, що мітохондріальна дисфункція є основною причиною

нітрозативно-окисного стресу і активізації РКС і транскрипційних факторів при ЦД2Т. Показано також зв'язок між ЕДФ та посиленням продукції вільних радикалів в артеріолах пацієнтів з діабетом [204].

ЦД2Т призводить до морфо-функціональних мікро- та макросудинних ушкоджень. При цьому ендотеліальні клітини є основними цілями для глюкозотоксичного пошкодження з огляду на їх здатність утилізувати глюкозу незалежно від наявності інсуліну [166]. Незважаючи на величезний обсяг робіт, присвячених механізмам активації ЕДФ, опосередкованої надлишком концентрації глюкози, чіткий ланцюг подій до кінця не встановлений. Беззаперечно, патогенетичні фактори ЦД2Т активують безліч сигнальних шляхів в ядрах ендотеліоцитів і клітин гладких м'язів судин, що призводить до експресії генів, які кодують утворення великої кількості біологічно активних пептидів та факторів, що беруть участь у регуляції функцій ендотелію, а в патологічних умовах – викликають його дисфункцію з подальшою загибеллю клітин.

1.3. Асоціація генетичних поліморфізмів з клінічними проявами ендотеліальної дисфункції

Аналіз частоти та поширеності ускладнень ЦД2Т показує, що швидкість їх клінічних проявів істотно залежить від якості глікемічного контролю [49,48,81]. Програмні дослідження встановили оптимальний рівень глікемії і роль гіперглікемії у зниженні ризику розвитку важких діабетичних ускладнень [172]. Проте в групах спостережень завжди були пацієнти, у яких навіть тривала, погано контрольована гіперглікемія не приводила до раннього розвитку судинних ускладнень. Було висловлено припущення про можливі генетичні відмінності, які здатні змінювати термін клінічної маніфестації та ступінь вираженості судинних ускладнень при ЦД [203,225,249]. Склалася думка про спільний вплив молекулярно-генетичних факторів і обумовлених ЦД2Т метаболічних порушень на формування ЕДФ [105].

Аналіз ключових ланок патогенезу ЕДФ дозволив виділити для вивчення в рамках даного дослідження чотири гена-кандидата: ген ендотеліальної NO-синтази (*NOS3*) у зв'язку з низькою активністю eNOS; ген фактора некрозу пухлин (*TNF α*), у зв'язку з наявністю запального компонента; ген ETa (*EDNRA*) та ген ETb (*EDNRB*), у зв'язку з високою активністю системи ендотеліну, в якій реалізуються ефекти ET1.

За даними on-line каталогу генів та генетичних розладів людини, проекту OMIM який підтримується у мережі Internet Університетом Джона Гопкінса (Johns Hopkins University), США (<http://omim.org>) ген *NOS3*, має локалізацію 7q36.1, кодує синтез eNOS; ген *TNF α* – 6p21.33, кодує синтез *TNF α* ; ген *EDNRA* – 4q31.22–q31.23, кодує синтез ETa; ген *EDNRB* – 13q22.3, кодує синтез ETb.

У ряді досліджень було встановлено асоціацію поліморфних генотипів вищезазначених генів з розвитком нефропатії, ретинопатії, полінейропатії і макросудинних ускладнень ЦД2Т. Різні поліморфізми одного і того ж гена змінюють активність кодованої геном субстанції, й тим самим надають різні за інтенсивністю або спрямованістю впливи на метаболізм, що формує фенотип та реактивність індивіда. Патогенетичне значення мають також варіанти комбінованого впливу SNP різних генів на метаболізм [215,218,225].

Поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* останнім часом приділяють чимало уваги. Показана його асоціація з атеросклерозом [68]. У дослідженні A.E. Atay et al. (2014) з'ясована роль *rs1799983* у виникненні гестаційного діабету на тлі погіршення функції рено-васкулярної системи. Встановлено, що розподіл генотипів, що мали мутаційний алель *T* (*GT+TT*) суттєво відрізнявся від розподілу генотипу *GG*. У цих хворих був відмічений значно більший рівень альбумінурії і NO у сироватці крові, з чого автори зробили висновок про високе прогностичне значення наявності алеля *T* для виявлення вагітних з ризиком розвитку гестаційного діабету [52]. У дослідженні S.M. Sadati et al. (2018) вивчено роль поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* у виникненні діабетичної виразки на стопі, що було асоційовано з наявністю мінорної гомозиготи [207].

Численні роботи вказують на важливу роль генних варіантів

поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* на розвиток та прогресування ЦД 2 типу. Так, у єгипетському дослідженні D. El-Lebedy (2018) було встановлено, що наявність мінорного алеля *T* збільшувала ризик розвитку ЦД2Т та серцево-судинних захворювань у таких хворих [92]. У широкомасштабному дослідженні J.Y. Li et al. (2015;2016) показана значуща різниця у розподілі мутантного алеля поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* і зроблено висновок про зв'язок цього поліморфізму з ЦД2Т [153,154]. У мета-аналізі виявлений зв'язок алеля *T* і генотипу *TT* поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* з ЦД2Т у домінантній і рецесивній моделях [131].

Всі ці дані, а також аналіз власних досліджень (загалом 4795 випадків та 3805 контролів) дозволили Ozra Tabatabaei-Malazy et al. (2017) доказово довести позитивний зв'язок цього поліморфізму з ЦД2Т [223]. Також у цьому дослідженні доведений зв'язок поліморфізмом *rs1799983* гена *NOS3* з розвитком діабетичної нефропатії. При цьому, поліморфізм *rs1799983* не впливав на активність NO у судинах нирки, але алель *T* був пов'язаний з підвищенням окисного стресу у таких випадках [229]. На значущий зв'язок поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* з розвитком діабетичної нефропатії вказувало також дослідження, що було проведено Р. Нюо et al. (2015) у Північному Китаї (431 хворих на ЦД2Т з нефропатією проти 420 хворих на ЦД2Т без неї) [119].

Роботою, що підсумує різні дані останніх років можна вважати розробку J. Rani та співавт. (2017) генетичного атласу ЦД 2 типу, який був складений шляхом інтегративного аналізу генів, пов'язаних з ЦД2Т та його ускладненнями з використанням бази *Gene Expression Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) [200]. Проаналізовано дані про 650 генів і 34 мікроРНК, які пов'язані з ЦД 2 типу та розвитком його ускладнень. Доведено, що сім генів – *AGER*, *TNFRSF11B*, *CRK*, *PON1*, *ADIPOQ*, *CRP* і *NOS3* мають зв'язок з розвитком серцево-судинних ускладнень, атеросклерозу, нефро-, ретино- та нейропатіями у хворих на ЦД2Т.

Виходячи з викладеного, можна вважати, що поліморфізм *rs1799983* гена *NOS3* (*G894T*), який призводить до заміни амінокислотної послідовності у молекулі ферменту (Glu298Asp), має відношення до ускладнень ЦД2Т.

Ще у мета-аналізі Z.H. Liu et al. (2013) у китайського населення популяції Хан, було встановлено наявність зв'язку алеля *A* поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* та генотипів за домінантною моделлю успадкування (*G/A+AA* проти *G/G*) з ризиком ЦД2Т і, що алель *A* є алелем ризику [160]. З іншого боку встановлено, що хворі на ЦД2Т з популяції Панджабі Ражпут не мали мінорного алеля *A* поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* [178], хоча рівень *TNFα* у них був істотно більше, ніж у контрольній групі. В той же час дослідженнями Програми 1000 Genomes Project Phase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>) показана наявність мінорного алеля *A* у представників Східної Азії ($f=0,059$). Чисельні дослідження показали, що у хворих на ЦД2Т частота цього алеля збільшена до 0,11-0,20 [84,128,160,214].

Дані G. Kaidonis et al. (2016) показали, що у бразильців алель *A* поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* був пов'язаний з розвитком ЦД 1-го типу, але не з ЦД2Т та розвитком діабетичної ретинопатії [134]. Також і дослідження N.A. Tavares et al. (2015) показали наявність такого зв'язку для поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* [227]. На відміну від цих результатів у дослідженні L.F. Sesti et al. (2015) показано що частота алеля *A* поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* була суттєво вище у хворих з проліферативною діабетичною ретинопатією, ніж в інших групах хворих та мала асоціацію з її розвитком за домінантною моделлю успадкування [214].

У індійських дослідженнях [84,87,128] показана наявність асоціації поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* з розвитком ЦД2Т. Крім того, у дослідженні U. Dhamodharan et al. (2015) показана наявність асоціації цього поліморфізму з діабетичною виразкою на стопі та приростом рівнів у крові IL-6, *TNFα* і хемокину SDF-1 у таких хворих [84]. У роботі K. Jamil et al. (2017) визначено, що поліморфізм гена *TNFα* -308G/A був потужним фактором ризику ЦД2Т, особливо для хворих у віці більше 45 років [128].

Системний огляд публікацій з 2000 по 2016 роки, зроблений G.I. Luna et al. (2016) звернув увагу на спірність результатів визначення впливу поліморфізму *rs1800629* гена *TNFα* на розвиток ЦД2Т у різних популяціях, що, на думку авторів, пов'язане з етнічними розходженнями та диктує

необхідність таких досліджень у кожній популяції окремо [162].

Дослідження [47,156] переконливо показали, що ЕДФ та система ET1 і його рецепторів приймає активну участь у розвитку діабетичних судинних ускладнень. Так, при ЦД2Т визначена підвищена експресія ET1 і рецепторів ETa, що відповідало ступеню нефропатії [160]. Дослідження словенських вчених довело наявність зв'язку поліморфізмів гена *EDNRB* з розвитком діабетичної ретинопатії [64]. Такі результати дозволили розглядати використання антагоністів ET1 для лікування діабетичної хвороби нирок: доклінічні експериментальні дослідження показали, що антагоністи рецептору ET1 знижували протеїнурію і мали нефропротекторну дію [108].

Резюме. У основі патогенезу ЕДФ лежать наступні ключові механізми: порушення синтезу ендотеліальної фракції NO за рахунок гальмування активності eNOS; зниження біодоступності NO на тлі окислювального стресу, активація утворення ET1 і експресія ендотелінових рецепторів з переважанням вазоконстрикції; запалення, що підтримується синтезом прозапальних цитокінів і викликає експресію iNOS, яка стимулює синтез значної кількості NO, вступаючого у вільнорадикальні реакції з утворенням цитотоксичних продуктів. Об'ємний матеріал накопичений за останні 20 років і присвячений дослідженням ролі генетичних чинників в розвитку ЦД2Т і його ускладнень, містить обнадійливі результати, які без сумніву призведуть до поглиблення розуміння молекулярного патогенезу діабету і розробки нових підходів до терапії захворювання. У той же час більшість досліджень мали суперечний характер. Відсутність послідовних результатів пояснюється, як правило популяційними і етнічними відмінностями при формуванні дослідницьких груп, що підкреслює необхідність проведення паралельних досліджень в кожній популяції. Проведений аналіз дозволив відібрати для виконання цієї роботи наступні чинники, що оцінюють стан ЕДФ: NO, eNOS, ET1, TNF α і ДК, а в якості поліморфізмів генів-кандидатів: *rs1799983* гена *eNOS*; *rs1800629* гена *TNF α* ; *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB*.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Характеристика хворих, що прийняли участь у дослідженні

До дослідження залучено дані 152 хворих з ЦД2Т, що перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні ендокринології Донецького обласного клінічного територіального медичного об'єднання у 2013-2014 р.р. та на базі Українського науково-дослідного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України у 2015-2016 р.р.

Вік пацієнтів склав від 34 до 80 років, у середньому ($M \pm SD$) $53,9 \pm 8,4$ років. Жінок було 95 (62,5 %), чоловіків – 57 (37,5 %). За тривалістю захворювання пацієнти розподілилися таким чином: до 1 року – 5 (3,3 %), від 1 до 3 років – 40 (26,3 %), від 4 до 5 років – 23 (15,1 %), від 6 до 7 років – 12 (7,9 %), від 8 до 10 років – 31 (20,4 %), від 11 до 15 років – 26 (17,1 %) і більше 15 років – 15 (9,9 %) хворих. У близьких родичів ЦД2Т був виявлений у 35 (23,0 %) хворих. На момент госпіталізації всі хворі отримували цукрознижувальну таблетовану терапію, а 77 з них (50,7 %) – інсулінотерапію.

Згідно до клінічної класифікації [25,37,41] 1 ступінь тяжкості не була виявлена у жодного пацієнта, 2 ступінь – у 120 (78,9 %) та 3 ступінь – у 32 (21,1 %) хворих. Хворих із 2 ступенем тяжкості було розподілено на 2 групи: 1-у – 57 (37,5 %) хворих та 2-у – 63 (41,4 %) хворих. Критерієм для їх розподілу було обрано ступінь компенсації цукрового діабету за рівнем глікованого гемоглобіну [32,41,40,42,110]: в 1-у групу були залучені хворі, які знаходились в стані компенсації або задовільної компенсації рівня гіперглікемії; в 2-у – в стані декомпенсації. Хворі з 3 ступенем тяжкості склали 3-ю групу.

До контрольної групи було залучено 95 практично здорових чоловіків і

жінок, які не мали порушень вуглеводного обміну і клінічної маніфестації відповідних симптомів, схожих з мікро- і макросудинними ускладненнями. Вік пацієнтів склав від 35 до 76 років, у середньому ($M \pm SD$) $53,7 \pm 11,3$ років. Жінок було 58 (61,0 %), чоловіків – 37 (38,9 %). Порівняння за віком і статтю не виявило вірогідних різниць з хворими ($p=0,916$ і $p=0,820$, відповідно).

У всіх пацієнтів було отримано інформовану згоду на участь в дослідженні. Критеріями виключення хворих ЦД2Т з дослідження були: наявність гострих діабетичних ускладнень, розвиток гострих інфекційних, аутоімунних та алергійних захворювань в процесі, або за 2-3 місяці до обстеження; неможливість для хворого чи його небажання продовжувати участь в обстеженні; наявність важких атеросклеротичних або ішемічних макросудинних ускладнень, а також соціальні протипоказання (вагітність, наявність важких невиліковних захворювань, порушення психіки та ін.).

Рішення про включення пацієнтів в дослідження приймали на 3-5 добу їх знаходження в стаціонарі. На всіх включених пацієнтів заповнювали спеціальну карту (рис. 2.1), яка включала необхідну для подальшого дослідження інформацію: паспортні дані (П.І.Б, вік, стать, № історії хвороби); антропометрію (зріст, маса тіла); діагноз (тип цукрового діабету, ступень важкості, ступень компенсації вуглеводного обміну); результати загальноклінічних (наявність і ступені діабетичних ускладнень, артеріальний тиск систолічний і діастолічний, діурез) і лабораторних досліджень (рівень глікемії натще; зміст у крові HbA1c, інсуліну, сечовини, креатиніну, холестерину, ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), тригліцеридів, лептину, рівні креатиніну сечі, глюкозурії і альбумінурії).

У всіх пацієнтів здійснювали забір крові з кубітальної вени для проведення біохімічних (вміст у крові NOx та ДК), імуноферментних (вміст у крові ET1, eNOS, TNF α) і молекулярно-генетичних (виявлення поліморфізмів *rs1799983*, *rs1800629*, *rs6842241* і *rs5351*) досліджень.

Під час первинного огляду всім пацієнтам виконували манжеткову пробу Румпеля-Леєде-Кончаловського (РЛК) [46,205,206].

КАРТКА ОБСТЕЖЕННЯ

Клінічне дослідження: РОЛЬ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ У РОЗВИТКУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2 ТИПУ

Шифр: _____ Вік: _____ р, Стать _____
№ IX: _____ Зріст: _____ м, Вага: _____ кг

ПІБ: _____

Діагноз: _____, тип _____, тривалість _____ р.

Ступінь тяжкості _____ Ступінь компенсації: _____

Примітки (вказати, якщо є) _____

Заявник _____

Клінічні показники

Ретінопатія (0, 1, 2, 3)		АТС (мм рт.ст.)	
Полінейропатія (0, 1, 2, 3)		АТД (мм рт.ст.)	
Нефропатія за ШКФ (0, 1, 2, 3 4)		Метформін (фон)	
Нефропатія за АУ(0, 1, 2)		Інсулін (фон)	
Ангіопатія нижніх кінцівок (0, 1)		Діурез л за добу	
Артеріальна гіпертензія (0, 1, 2, 3)		Проба РЛК (0, 2+, 3+, 4+)	

Лабораторні показники

Глікемія, ммоль/л		Холестерін, ммоль/л	
Інсулін, мкМО/мл		ЛПНЩ, г/л	
HbA1c, %		Тригліцериди, ммоль/л	
Сечовина, ммоль/л		Лептин, нг/мл	
Креатинін, мкмоль/л			
Глюкозурія, г/л		ЕТ-1, пмоль/л	
Альбумінурія, мг/д.		NO ₂ , мкмоль/л	
		eNOS, пг/мл	
		TNFα, пг/мл	
		ДК, од./мл	

Генетичні показники

NOS3 rs1799983		EDNRA rs6842241	
TNFα rs1800629		EDNRB rs5351	

МП Заявник _____ / _____ /
Консультант _____ / _____ /
(вказати посаду)

Рис. 2.1. Картка обстеження хворого

2.2. Встановлення діагнозу цукрового діабету 2-го типу, наявності та ступеню ускладнень

Діагноз ЦД2Т був встановлений відповідно до «Уніфікованого клінічного протоколу первинної та вторинної (спеціалізованої) медичної

допомоги «Цукровий діабет 2 типу», затвердженого Наказом МОЗ України від 21.12.2012 р. за №1118 «Про затвердження та впровадження медико-технологічної допомоги при цукровому діабеті 2 типу» [37].

Ступінь важкості ЦД2Т оцінювалася за критеріями відсутності або наявності у хворих макро- і мікросудинних ускладнень і полінейропатії, а також, у разі наявності цих ускладнень, – їх ступенів тяжкості [37].

Діабет легкого перебігу класифікували при відсутності макро- і мікросудинних ускладнень. Середню ступень важкості ЦД2Т характеризували наявність діабетичної ретинопатії в непроліферативній стадії, діабетичної нефропатії в стадії мікроальбумінурії і діабетичної полінейропатії. Для тяжкого перебігу ЦД2Т було характерним наявність діабетичної ретинопатії в препроліферативній або проліферативній стадії, діабетичної нефропатії в стадії протеїнурії або хронічної хвороби нирок, вегетативної полінейропатії та макроангіопатій: ураження нижніх кінцівок, проявів кардіосклерозу і порушень мозкового кровообігу.

Ступінь компенсації гіперглікемії за рівнем глюкози оцінювалася на підставі етапів прогресування ЦД2Т [25,41]. Згідно до цієї класифікації 1-му ступеню відповідав етап компенсації гіперглікемії з нормоглікемією натще на тлі інсулінорезистентності і гіпертрофії бета-клітин підшлункової залози. Далі (2-й ступень) слідував етап стабільної адаптації з помірною гіперглікемією до 6,5 ммоль/л. Третій етап (3-й ступінь) – транзиторна гіперглікемія, коли виявляли нестабільну декомпенсацію вуглеводного обміну: рівень глюкози натще більше 7 ммоль/л. Виражена гіперглікемія (4-й ступінь) – 16-20 ммоль/л характеризувала четвертий етап стабільної декомпенсації. П'ятий етап (5-а ступінь) – виражена декомпенсація з рівнем глюкози натще більше 20 ммоль/л, характеризувала критичну втрату маси бета-клітин підшлункової залози.

Іще одним загальновизнаним методом оцінки компенсації ЦД2Т, що було використано в дослідженні, є рівень у крові HbA1c [30,32,34,41,42,49,110]. Стадію компенсації або задовільної компенсації рівня гіперглікемії діагностували при значеннях HbA1c до 7,5 %. Вище цієї межі

визнавали наявність низької якості глікемічного контролю, який перебував у стані декомпенсації.

За результатами клініко-лабораторних обстежень, виконаних лікарями-спеціалістами з ендокринології, офтальмології, невропатології, терапії і хірургії визначали наявність ретинопатії, сенсорної полінейропатії, нефропатії за рівнями альбумінурії та швидкістю клубочкової фільтрації, макроангіопатії нижніх кінцівок та артеріальної гіпертензії.

Діагноз діабетичної ретинопатії встановлювався лікарем офтальмологом після проведення офтальмологічного дослідження, яке включало за показаннями: пряму офтальмоскопію для огляду очного дна; біомікроскопію передніх відділів ока; вимірювання внутрішньоочного тиску, визначення гостроти і полів зору. Згідно до клінічних настанов [37,172,239] виявляли три стадії діабетичної ретинопатії від найбільш легкої за ступенем тяжкості до важкої: непроліферативну; препроліферативну і проліферативну.

Діагностика діабетичної полінейропатії виконувалася лікарем-неврологом і ґрунтувалася за рекомендаціями [37,38,172] на діагностичній системі P.J. Dyck (1988) [90], згідно з якою діагноз виставляли на підставі наявності симптомів нейропатії, відповідних результатів неврологічного обстеження, функціональних тестів і досліджень проведення імпульсів по моторним і/або сенсорним нервовим волокнам. За цими критеріями діагностували чотири стадії діабетичної полінейропатії. 0-а стадія характеризувалася відсутністю об'єктивних даних за наявність полінейропатії. 1-а стадія (субклінічна або безсимптомна), розподілялася на два підвиди: 1А, коли при обстеженні виявляли лише порушення неврологічних тестів та 1В, при якій додатково виявляли порушення під час неврологічного огляду. В 2-й клінічній (симптоматичній) стадії полінейропатії також віділяли два підвиди: 2А – наявність симптомів діабетичної полінейропатії у поєднанні з позитивними результатами неврологічних тестів або вираженим сенсорним дефіцитом та 2В – наявність симптомів полінейропатії з залученням до патологічного процесу рухових нервових волокон. 3-я стадія – важка нейропатія з порушенням

працездатності та/або соціальної адаптації (виражений больовий синдром, синдром діабетичної стопи, важка ортостатична гіпотонія).

Діагностику наявності і стадійності діабетичної нефропатії здійснювали на основі визначення рівня альбумінурії та розрахунку швидкості клубочкової фільтрації за рівнем креатиніну [37,139,172]. Стадія нормоальбумінурії характеризувалася вмістом альбуміну в сечі менше 30 мг. Для стадії мікроальбумінурії був характерним вміст альбуміну в сечі від 30 мг до 300 мг. Вміст альбуміну в сечі більше 300 мг свідчив про протеїнуричну стадію діабетичної нефропатії. Оцінку ниркової функції за величиною швидкості клубочкової фільтрації здійснювали наступним чином: величини показника понад 90 мл/хв. відповідали нормальної або підвищеної функції нирок; 60-89 мл/хв. – незначне зниження функції; 30-59 мл/хв. – помірне зниження функції; 15-29 мл/хв. – значне зниження функції і значення швидкості клубочкової фільтрації менше за 15 мл/хв. характеризувало термінальну стадію ниркової недостатності.

Вимірювання артеріального тиску за «офісним» протоколом і класифікацію результатів здійснювали згідно рекомендацій [70,93,168,242]. Категорію оптимального тиску діагностували при значеннях АТс менше 120 мм рт. ст. і АТд – менше 80 мм рт. ст. Категорію нормального тиску діагностували в двох варіантах АТс/АТд: нормальний артеріальний тиск – 120-129/80-84 мм рт. ст. і високий нормальний – 130-139/85-89 мм рт. ст. Артеріальну гіпертензію 1, 2 і 3 ступенів класифікували при значеннях АТс/АТд 140-159/90-99 мм рт. ст., 160-179/100-109 мм рт. ст. і 180/110 і більше мм рт. ст., відповідно. Окремою категорією виділяли ізольовану систолічну артеріальну гіпертензію при значеннях АТс 140 і більше мм рт. ст. і АТд менше 90 мм рт. ст.

Наявність макроангіопатії нижніх кінцівок діагностував лікар-хірург згідно настанов [5,37,172]. В обсязі цієї роботи використовували висновок у формі твердження наявності або відсутності у хворого даного ускладнення.

Результати манжетової проби РЛК [46,205,206] використовували для оцінки функції ендотелію. При проведенні проби накладали манжетку

тонометра на плече і роздмухували її так, щоб тиск в ній був середнім між АТс і АТд пацієнта. Через 5 хвилин манжетку знімали і підраховували кількість петіхій в обмеженій 25-ю квадратними сантиметрами довільно обраної області передпліччя. Наявність 10 і менш петіхій в обраному квадраті вважали нормальною реакцією судинного русла, а результати проби – негативними. Позитивний результат проби, якій асоціювали з ЕДФ, оцінювали за такою шкалою: 11-20 петіхій – 2+; 21-50 петіхій – 3+ і більше 50 петіхій – 4+.

Вищеописані стадії і категорії були конвертовані в порядкові змінні (ступені, бали) і використані в подальшому під час опису результатів, для розрахунку ІТХ і математичній обробці результатів (табл. 2.1.).

Таблиця 2.1

Конвертація якісних показників (категорій і стадій) в порядкові змінні (ступені, бали)

Показник	Стадія, категорія	Ступінь, бали
Ступені важкості ЦД2Т	Легкий	1
	Середній	2
	Тяжкий	3
Компенсація гіперглікемії за етапами прогресування ЦД2Т	Нормоглікемія натще	1
	Стабільна адаптація (глікемія натще до 6,5 ммоль/л)	2
	Нестабільна декомпенсація (глікемія більш за 7,0 ммоль/л)	3
	Стабільна декомпенсація (глікемія 16-20 ммоль/л)	4
	Виражена декомпенсація (глікемія більш за 20 ммоль/л)	5
Компенсація гіперглікемії за HbA1c	Повна компенсація (HbA1c < 7,0 %)	1
	Задовільна компенсації (HbA1 від 7,0 % до 8 %)	2
	Декомпенсація (HbA1c > 8,0 %)	3
Стадії діабетичної ретинопатії	Непроліферативна	1
	Препроліферативна	2
	Проліферативна	3

Продовження таблиці 2.1

Показник	Стадія, категорія	Ступінь, бали
Стадії діабетичної полінейропатії	Відсутність об'єктивних даних за наявність полінейропатії	0
	Безсимптомна стадія (1A і 1B)	1
	Стадія клінічних проявів (2A і 2B)	2
	Важка нейропатія	3
Стадії діабетичної нефропатії за альбумінурією	Нормоальбумінурія (альбумінурія менше 30 мг/добу)	0
	Мікроальбумінурія (альбумінурія від 30 мг/добу до 300 мг/добу)	1
	Протеїнурія (альбумінурія більш за 300 мг/добу)	2
Стадії діабетичної нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації	Ниркова функція нормальна або підвищена (ШКФ > 90 мл/хв.)	0
	Незначне зниження функції (ШКФ від 60 мл/хв. до 89 мл/хв.)	1
	Помірне зниження функції (ШКФ від 30 мл/хв. до 59 мл/хв.)	2
	Значне зниження функції (ШКФ від 15 мл/хв. до 29 мл/хв.)	3
	Термінальна стадія ниркової недостатності (ШКФ менше за 15 мл/хв.)	4
Категорії результатів вимірювання артеріального тиску	Оптимальний, нормальний і високий нормальний тиски	0
	Артеріальна гіпертензія 1 ступеня	1
	Артеріальна гіпертензія 2 ступеня	2
	Артеріальна гіпертензія 3 ступеня	3
Наявність макроангіопатії нижніх кінцівок	Відсутні клінічні прояви	0
	Наявна	1
Результати проби РЛК	Негативний	1
	Позитивний 2+	2
	Позитивний 3+	3
	Позитивний 4+	4

2.3. Забір крові і сечі та методики лабораторних досліджень

У всіх пацієнтів здійснювали забір крові з використанням вакуумних систем типу “BD Vacutainer”. Кров брали вранці натщесерце, з кубітальної вени в кількості 10 мл. При необхідності отримання сироватки

використовували пробірки, які не містили консервант. Для отримання плазми кров збирали в пробірки з калієвою сіллю етілендіамінтетраоцтової кислоти (K_2EDTA). Далі пробірки центрифугували протягом 20 хв. з прискоренням 1500 g при температурі 4°C в центрифугі K23 (Німеччина). Отриману плазму або сироватку поміщали в промарковані пластикові пробірки для подальшого зберігання при температурі -70°C до проведення аналізів. Визначення вмісту HbA1c проводили в той же час. Кров для молекулярно-генетичних досліджень збирали в пробірки без консерванту, маркували і зберігали при температурі -70°C.

Сечу для визначення глюкозурії і альбумінурії збирали протягом доби в пластиковий контейнер, який зберігали при температурі 4-6°C. Через 24 години збору сечі вміст контейнера перемішували, вимірювали загальний об'єм і відбирали в промарковану пластикову пробірку обсягом 50 мл для подальшого зберігання при температурі -70°C до проведення аналізів. Загальний об'єм сечі фіксували в картку, як діурез.

Біохімічні дослідження для визначення концентрації в сироватці крові глюкози, креатиніну, сечовини, холестерину, ліпопротеїнів низької щільності, тригліцеридів, а також вмісту глюкози в сечі проводили на автоматичному аналізаторі RT-200C plus (Rayto, Китай) з використанням реактивів Audit Diagnostics (Ірландія): «Glucose HEX», «Creatinine ENZYMATIC (MPR)», «Urea UV (MPR)», «Cholesterol (MPR)», «LDL Cholesterol DIRECT PLU»S, «Triglycerides».

Перераховані вище дослідження виконували також на біохімічному аналізаторі Sinnowa BS-3000M (Sinnowa Medical Science&Technology Co., Ltd, Китай) з використанням реактивів Glükóz GOD/PAP folyékony, Karbamid U.V. folyékony, Kreatinin Enzimatikus folyékony, Koleszterin PAP folyékony, LDL Koleszterin Direkt folyékony, Triglicerid PAP folyékony (Diagnosticum Zrt., Угорщина).

Референтні значення: вміст в сироватці крові глюкози – 3,3-5,5 ммоль/л, креатиніну для чоловіків – 62-115 мкмоль/л, для жінок – 53-97

мкмоль/л, сечовини – 17-56 ммоль/л, холестерину – 5,18-6,19 ммоль/л, ліпопротеїнів низької щільності – < 3,400 г/л, тригліцериди – < 1,695 ммоль/л. Вміст глюкози в сечі – <0,504 г/добу.

Вміст глікованого гемоглобіну в крові визначали на автоматичному аналізаторі RT-200C plus (Китай) з використанням реактивів фірми Audit Diagnostics (Ірландія): «HbA1c ENZYMATIC», а також на автоматичному аналізаторі гемоглобіну «D 10TM» (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Референтні значення: 4,5-6,5% від загального вмісту гемоглобіну.

Біохімічними методами визначали вміст в крові NO та ДК. NO у сироватці крові оцінювали за сумарним рівнем його стабільних метаболітів (NOx) – нітритів (NO₂⁻) і нітратів (NO₃⁻). Визначення проводили за NO₂⁻ із застосуванням реактиву Гріса [4]. Відновлення NO₃⁻ до NO₂⁻ в інкубаційному середовищі здійснювали за допомогою хлористого ванадію (VCl₃) [173]. Основні етапи визначення: зразки сироватки депротейнізували додаванням до 0,4 мл сироватки 0,8 мл 0,5 N NaOH і 0,8 мл 10 % розчину сульфату цинку. Вміст пробірки перемішували 30 с і центрифугували протягом 15 хв. при 9000 g. Надосадову рідину в об'ємі 1,5 мл змішували з рівними об'ємами реактиву Гріса (1 % сульфаніламід, 0,1 % нафтилендіамін, 2,5 % фосфорної кислоти) і свіжоприготованого розчину VCl₃ (400 мг VCl₃ в 50 мл 1N HCl) й інкубували 30 хв. при кімнатній температурі. Абсорбцію розчину оцінювали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 546 нм. Як стандарт використовували нітрит натрію.

Визначення ДК в плазмі крові засноване на вимірі піку поглинання екстракту кон'югатів дієнових структур гідроперекисів ліпідів в гептан-ізопропіловій суміші [3]. Основні етапи визначення: екстракції піддавали 0,2 мл плазми крові, до яких додавали 4 мл гептан-ізопропанолової суміші (1:1) з подальшим струшуванням протягом 10-15 хв. Після цього в пробірку додавали ще 1 мл 0,01N розчину соляної кислоти і 2 мл гептану, інтенсивно струшували і після відстоювання і розшарування суміші на протязі 20-30 хв., відбирали гептановий шар, в якому вимірювали екстинцію при довжині хвилі

233 нм. В якості контрольної проби використовували зразок, що містив замість плазми 0,2 мл дистильованої води і пройшов усі перераховані вище види обробки. Зміст ДК розраховували як здобуток значення оптичної щільності зразка і фактору розведення плазми гептановим розчином.

Оптичну щільність розчинів під час біохімічних досліджень рівня NOx і ДК вимірювали на приладі «SPECORD-200» (Німеччина).

У плазмі крові імуноферментним методом з використанням відповідних тест-систем визначали вміст інсуліну і лептину («Insulin ELISA», «Leptin ELISA» DRG International Inc., USA), а також чинників ЕДФ: ET1 («big ENDOTELIN-1», Biomedica Immunoassays, Австрія), eNOS («Human eNOS», R&D Systems, США) і TNF α («Human TNF α », Bender Medsystems, Австрія). У сечі визначали концентрацію альбуміну за допомогою імуноферментного методу з використанням наборів реактивів «Micro-Albumin ELISA» (DRG International Inc., USA). Добову екскрецію альбуміну розраховували з його концентрації в перерахунку на добовий діурез.

У тест-системах з метою кількісного визначення зазначених речовин використовується принцип двосайтового імуноферментного аналізу (сендвіч-метод). У лунки планшета з іммобілізованим специфічним антигеном вносили досліджуваний зразок і кон'югат, що містить анти-специфічні антитіла, мічені пероксидазою. Відповідна речовина із зразка в цих умовах зв'язується з антигеном на поверхні лунки та кон'югатом. Незв'язаний матеріал видаляється відмивкою. Після відмивки активність визначаємої речовини, зв'язаної на поверхні лунки планшета, проявляється додаванням субстрату (ТМБ). Інтенсивність кольорової реакції прямо пропорційна її кількості у зразку. Концентрацію визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної щільності від змісту речовин в калібрувальних пробах. Інтенсивність забарвлення продуктів імуноферментних реакцій кількісно вимірювали на планшетному рідері «Multiscan EX» Thermo Electron Corp. (Фінляндія) при довжині хвилі 450 нм. Референтне значення для альбуміну сечі – <30 мг/добу.

Аналіз поліморфізмів *rs1799983* гена *NOS3* (генна локалізація 7q36.1), *rs6842241* гена *EDNRA* (генна локалізація 4q31.22) і *rs5351* гена *EDNRB* (генна локалізація 13q22.3) проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. На першому етапі дослідження проводили виділення геномної ДНК з цільної венозної крові з використанням стандартних реактивів «PureLink® Genomic DNA Kit For Purification of Genomic DNA»; виробник INVITROGEN (США). На другому етапі проведено ПЛР у реальному часі вивчаємих зразків з використанням уніфікованих тест-систем «TaqMan Mutation Detection Assays» Life-Technology (США) в автоматичному ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, Inc., США). Контекстні послідовності для поліморфізмів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351* були відповідними:

CCCTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGA [G/T]CCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCCC,
TATTCTGGTTGGCTGATTCTCCCTC[A/C]TAGAGAAGCTGTAAGATTAGTGAAC,
ATGGCAAGCAGAAATAGAAACTGAA[C/T]AGCCACCAATCTTTTGCTGTCTTGT.

Принцип методу заснований на використанні процесу ампліфікації ДНК, що полягає в повторюваних циклах температурної денатурації ДНК, відпалу праймерів, з подальшим нарощуванням полінуклеотидних ланцюгів з цих праймерів Таq-полімеразою. У реакційну суміш для проведення ПЛР введені ДНК-зонди, кожен з яких навантажений флуоресцентною міткою і гасителем флуоресценції. При утворенні алель-специфічного продукту ампліфікації ДНК-зонд руйнується, дія гасителя на флуоресцентну мітку припиняється, що веде до зростання рівня флуоресценції. Останній прямо пропорційний кількості алель-специфічних ампліконів, що утворилися і вимірюється при кожному циклі ампліфікації. Для детекції продуктів ампліфікації, пов'язаних з нуклеотидними замінами згідно до контекстної послідовності, в наборах використані мітки VIC/FAM. Програма автоматичного ампліфікатора аналізує швидкості зростання рівнів флуоресценції для кожної мітки. Аналіз дозволяє дати три типи висновків для кожної досліджуваної проби: гомозигота по 1-му алелю контекстної

заміни нуклеотидів (мітка VIC), гомозигота по 2-му алелю контекстної заміни нуклеотидів (мітка FAM), чи гетерозигота.

Аналіз поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* (SNP у промоторному регіоні -308G/A; генна локалізація бр21.33) проведено методом ПЛР з подальшою електрофоретичною детекцією продуктів ампліфікації. Виділення геномної ДНК з лейкоцитів цільної венозної крові проводили з використанням стандартних реактивів «ДНК-експрес-кров» НПФ «Літех» (РФ). З кожним зразком виділеної ДНК проводили ампліфікацію з двома алель-специфічними праймерами, відповідними до контексту SNP (G/A). Кожен цикл ампліфікації у присутності ферменту Taq-полімерази призводив до подвоєння числа копій алель-специфічної ампліфікуємої ділянки, що дозволяє за 30-40 циклів «напрацювати» фрагмент ДНК в кількості, достатній для детекції. В якості набору реагентів для ампліфікації застосовували «SNP-експрес, TNF G-308A», НПФ «Літех» (РФ).

ПЛР проводили на ампліфікаторі «GeneAmp PCR System 2400» (Applied Biosystems, Inc., США). Реакційну суміш поміщали в прогрітий до 94°C осередок термоциклеру. Програма подальшої інкубації приведена в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Програма ампліфікації алельного поліморфізму гена *TNF α*

Блок програми	Температура, °C	Тривалість, с	Кількість циклів
1	93	60	1
2	93	10	35
	64	10	
	72	20	
3	72	60	1
4	10	зберігання	-

Детекцію алель-специфічних фрагментів ДНК здійснювали в 3% агарозному гелі, виготовленому на TAE-буфері після електрофорезу в горизонтальній камері при напруженості електричного поля 10 В/см від джерела постійного струму «Ельф-4» (ТОВ «ДНК-Технологія», РФ).

Кожна проба ДНК займала в гелі 2 лунки. В першу вводили ампліфіковану реакційну суміш з праймерами, специфічними до *G*-алеля, у другу – до *A*-алеля. Для фарбування фрагментів ДНК використовували 1% розчин бромистого етидію (5 мкл на 50 мл використаного гелю). Візуалізацію забарвлених фрагментів ДНК здійснювали в прохідному ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 312 нм в транслюмінаторі «TFX-20 M» («Vilber Lourmat», Франція).

Типовий вид гелю після фореузу представлений на рис. 2.2. Аналіз зображення дозволяє дати три типи висновків для кожної досліджуваної проби: гомозигота по алелю *G* (*G/G*) при наявності смуги в першій доріжці; гомозигота по алелю *A* (*A/A*) при наявності смуги в другій доріжці; гетерозигота (*G/A*) при наявності смуг в обох доріжках.

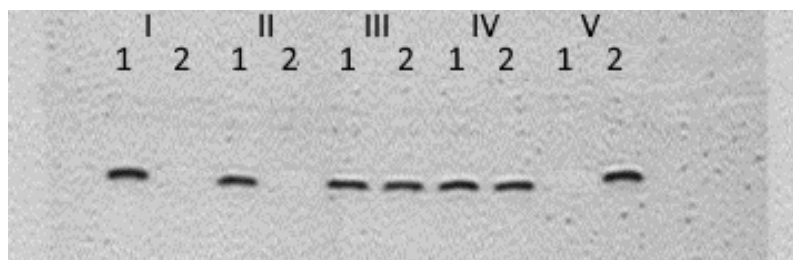


Рис. 2.2. Фрагмент гелю після електрофореузу продуктів ампліфікації при аналізі алельного поліморфізму гена *TNFα*:

I, II, III, IV, V – номери досліджуваних зразків;

1 – доріжки містять фрагменти ДНК, специфічні до алеля *G*;

2 – доріжки містять фрагменти ДНК, специфічні до алеля *A*.

зразки I і II – генотип *G/G*;

зразок V – генотип *A/A*;

зразки III і IV – генотип *G/A*

2.4. Математична обробка результатів дослідження

У дослідженні було запропоновано та використання оригінального індексу тяжкості хвороби – ІТХ. Величина цього індексу є відношенням сумарної ступені тяжкості діабетичних ускладнень, наявних у хворого на

ЦД2Т, до його віку, виражене в умовних одиницях (ум. од.). ІТХ безпосередньо пов'язаний з швидкістю прогресування ускладнень захворювання, а отже характеризував тяжкість перебігу діабету.

ІТХ розраховували за формулою:

$$ITX = (\sum_{i=1}^n CTU_i) / B * 100 \quad (2.1),$$

де СТУ – ступені тяжкості діабетичних ускладнень наявних у пацієнта згідно до табл. 2.1;

В – вік пацієнта (років).

ІМТ обчислювали за формулою:

$$IMT = \frac{B}{Z^2} \quad (2.2),$$

де В – маса пацієнта в кг;

З – зріст пацієнта в м.

Розраховували величини індексів, що характеризували стан інсулінової регуляції вмісту глюкози у крові. Значення індексу інсулінорезистентності – НОМА-ІР розраховували за формулою:

$$НОМА - ІР = \frac{\text{глюкоза}(0) * \text{інсулін}(0)}{22,5} \quad (2.3),$$

де глюкоза (0) – концентрація глюкози у крові натще, ммоль/л;

інсулін (0) – концентрація інсуліну в крові натще, мкМО/мл.

Індекс функціонування β-клітин підшлункової залози – НОМА-ФБК розраховували за формулою:

$$НОМА - ФБК = \frac{\text{інсулін}(0) * 20}{\text{глюкоза}(0) - 3,5} \quad (2.4),$$

де: глюкоза (0) – концентрація глюкози у крові натще, ммоль/л;

інсулін (0) – концентрація інсуліну в крові натще, мкМО/мл.

Розрахунок індексу чутливості до інсуліну – QUICKI) здійснювали за формулою:

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\log \text{інсулін}(0) + \log \text{глюкоза}(0)} \quad (2.5),$$

де глюкоза (0) – концентрація глюкози у крові натще, ммоль/л;

інсулін (0) – концентрація інсуліну в крові натще, мкМО/мл.

Розрахунок ШКФ проводили за формулою CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) [139]:

$$\text{ШКФ} = a * (\text{Cr} * 0,0113/b)^c * 0,993^{\text{Age}} * d \quad (2.6),$$

де Cr – креатинін сироватки, мкмоль/л;

Age – вік;

Для жінок: $a=144$; $b=0,7$; $c=-0,329$, якщо $\text{Cr} \leq 62$ мкмоль/л або $c=-1,209$, якщо $\text{Cr} > 62$ мкмоль/л;

Для чоловіків: $a=141$; $b=0,9$; $c=-0,411$, якщо $\text{Cr} \leq 80$ мкмоль/л або $c=-1,209$, якщо $\text{Cr} > 80$ мкмоль/л;

$d=1,159$ у представників чорношкірої раси або $d=1$ – у інших.

Для статистичної обробки отриманих даних використовували програму Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA). Кожну статистичну вибірку оцінювали на предмет характеру розподілу даних – проводили тести Kolmogorov-Smirnov (KS), Anderson-Darling (AD) і хі-квадрат (χ^2). Нормальність розподілу підтверджували при $p > 0,05$ (табл. 2.3).

Таким чином кількісні змінні всіх варіаційних рядів, що були залучені в роботу мали характер розподілу відмінний від нормального. У зв'язку з цим для їх описової статистики використовували медіану (Me), перший і третій квартиль (Q1; Q3).

Дві незалежні вибірки даних порівнювали із застосуванням критерію Манна-Уїтні (U), залежні – критерію Вілкоксона (W). Три і більше вибірок оцінювали за допомогою рангового дисперсійного аналізу Краскала-Уолліса (H) для незалежних змінних. Для порівняння частот категоріальних змінних використовували непараметричні критерії χ^2 Пірсона в модифікації Єйтса і двосторонній точний метод Фішера (Fet2).

Достовірність відмінностей в розподілі частот генотипів і алелей при порівнянні груп «випадок-контроль» оцінювали за допомогою аналізу таблиць спряженості (3×2 і 2×2 , відповідно) за критерієм χ^2 . Ступінь асоціації генотипів і алелей з захворюванням визначали за величиною відношення шансів – ВШ. Статистичну значущість підвищення ризику підтверджувала величина ВШ більше 1, за тієї умови, що вона потрапляла в 95 % вірогідний інтервал (95% ВІ). Відповідно, на значущість зниження ризику вказувала величина ВШ менше 1.

Таблиця 2.3

Результати перевірки на нормальність розподілу кількісних змінних

Показник	p(KS)	p(AD)	p(χ^2)
Вік, років	0,120	0,313	0,047
Тривалість захворювання, років	0,019	0,012	7,07e-14
ІМТ, кг/м ²	0,160	0,074	0,002
АТс, мм рт. ст.	0,007	0,008	0,00e-01
АТд, мм рт. ст.	9,00e-05	0,004	0,00e-01
Глікемія, ммоль/л	6,68e-08	2,19e-04	0,00e-01
Інсулін, мкМОд./мл	0,010	4,94e-04	0,00e-01
HbA1c, %	0,00e-01	0,00e-01	0,00e-01
Сечовина, ммоль/л	0,682	0,496	0,153
Креатинін, мкмоль/л	4,33e-04	0,002	2,20e-05
Діурез, л/добу	0,00e-01	0,00e-01	0,00e-01
Холестерин, ммоль/л	0,028	0,054	6,90e-05
Ліпопротеїни низькою щільності, г/л	0,232	0,400	0,005
Тригліцериди, ммоль/л	0,002	4,75e-04	0,00e-01
Лептин, нг/мл	7,80e-05	9,50e-05	0,00e-01
Глюкозурія, г/л	7,00e-06	6,00e-06	0,00e-01
Альбумінурія, мг/добу	0,00e-01	0,00e-01	0,00e-01

Продовження таблиці 2.3

Показник	$P_{(KS)}$	$P_{(AD)}$	$P_{(\chi^2)}$
ET1, фмоль/мл	7,03e-09	1,59e-06	0,00e-01
NOx, мкмоль/л	2,56e-04	8,98e-04	0,00e-01
eNOS, пг/мл	0,016	0,001	0,00e-01
TNF α , пг/мл	0,001	0,002	0,00e-01
ДК, Од./мл	0,00e-01	0,00e-01	0,00e-01

Вивчення впливу факторних змінних на залежні, а також розробка математичних моделей виконувалася з використанням лінійного та нелінійного, одно- і багатофакторного регресійного аналізів в обчислювальних середовищах GLZ і GRM. Залежні і незалежні змінні, що використано для побудови математичних моделей та їх відповідність змінним регресійних рівнянь презентовано у таблиці 2.4.

Таблиця 2.4

**Відповідність показників регресійних рівнянь категоріальним,
безперервним і індикаторним значенням**

Показники	Категоріальне значення	Індикаторне значення	Назва змінних регресії	Застосоване для розрахунків
Незалежні змінні				
<i>NOS3</i> <i>rs1799983</i>	<i>G/G</i>	101	NOS3	індикаторне значення
	<i>G/T</i>	102		
	<i>T/T</i>	103		
<i>TNF</i> <i>rs1800629</i>	<i>G/G</i>	101	TNF	індикаторне значення
	<i>G/A</i>	102		
	<i>A/A</i>	103		
<i>EDRNA</i> <i>rs6842241</i>	<i>C/C</i>	101	EDRNA	індикаторне значення
	<i>C/A</i>	102		
	<i>A/A</i>	103		
<i>EDRNB</i> <i>rs5351</i>	<i>C/C</i>	101	EDRNB	індикаторне значення
	<i>C/T</i>	102		
	<i>T/T</i>	103		
ET1	-	-	ET1	безперервне значення
NOx	-	-	NOx	безперервне значення

Продовження таблиці 2.4

Показники	Категоріальне значення	Індикаторне значення	Назва змінних регресії	Застосоване для розрахунків
eNOS	-	-	eNOS	безперервне значення
TNF α	-	-	TNF α	безперервне значення
ДК	-	-	ДК	безперервне значення
Залежні змінні				
Наявність ретинопатії	N	0	P _(РП)	індикаторне значення
	Y	1		
Наявність полінейропатії	N	0	P _(ПНП)	індикаторне значення
	Y	1		
Наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації	N	0	P _(НП ШКФ)	індикаторне значення
	Y	1		
Наявність нефропатії за альбумінурією	N	0	P _(НП АУ)	індикаторне значення
	Y	1		
Наявність артеріальної гіпертензії	N	0	P _(АГ)	індикаторне значення
	Y	1		
Наявність макроангіопатії нижніх кінцівок	N	0	P _(АНК)	індикаторне значення
	Y	1		
ІТХ	-	-	ІТХ	безперервне значення

Відбір статистично значущих незалежних змінних регресійних рівнянь (предикторів) здійснювали в режимі покрокового виключення. Розраховували коефіцієнти регресії (β) їх стандартні помилки (SE) та значущість їх відмінностей від нульової гіпотези за критерієм t для лінійних, або Wald-статистики (Wald) для логістичних моделей. Для оцінки адекватності побудованих лінійних моделей використовували коефіцієнти множинної кореляції (R) і детермінації (R²), а також критерій Фішера (F). Про адекватність логістичних моделей судили по кривим операційних

характеристик (ROC), при цьому розраховували площу під ROC-кривою – AUC. Модель вважали адекватною при статистично значущій відмінності AUC від 0,5. Для логістичних моделей розраховували Wald статистику, коефіцієнти максимальної правдоподібності ($-2 \cdot \log$) та χ^2 .

У завданнях бінарної класифікації, які вирішують логістичні моделі, важливим є вибір точки відсікання (cut-of-point) на ймовірнісній кривій, тобто поріг ймовірності, що розділяє два класи прогнозованих подій – негативний і позитивний. Найчастіше оптимальною точкою відсікання вважають точку рівноваги в якій чутливість співпадає із специфічністю моделі. Вибір точки відсікання дозволяє управляти ймовірністю правильного розпізнавання позитивних і негативних прогнозів.

На рис. 2.3 представлений приклад частотно-ймовірнісної діаграми залежності чутливості, специфічності і правильності від значення ймовірності. Точка відсікання відповідає точці перетину графіків цих показників.

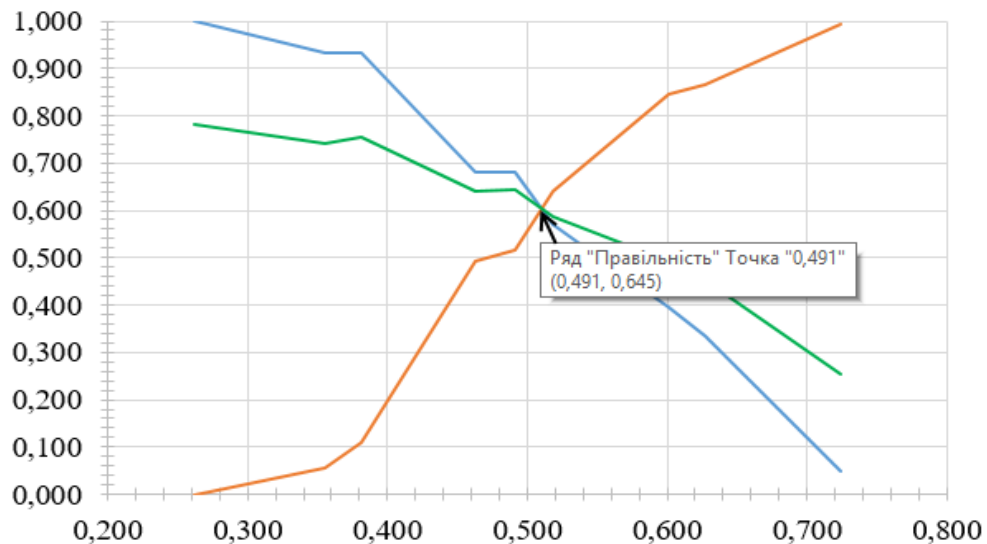


Рис. 2.3. Залежність чутливості, специфічності і правильності регресійної моделі від ймовірності.

В наведеному прикладі Cut-of-point=0,491.

За вертикальною віссю зазначені показники чутливості (блакитна діаграма), специфічності (помаранчева діаграма) і правильності (зелена діаграма); за горизонтальною – ймовірність.

На підставі аналізу показників чутливості, специфічності і правильності оцінювали класифікаційні властивості логістичних регресійних моделей шляхом порівняння частот фактичних і прогнозованих позитивних і негативних результатів з використанням критерія F_{et2} .

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНИХ ПОКАЗНИКІВ ПО ГРУПАМ ХВОРИХ

3.1. Характеристика клініко-лабораторних показників, частоти та ступеню ускладнень по групах хворих

Аналіз розподілу пацієнтів по групах показав (табл. 3.1), що медіана віку суттєво не відрізнялася у контрольній (рис. 3.1), 1-й та 2-й групах, тоді як у хворих 3-ї групи – вона була вищою (59,0 років; $p=0,033$).

Таблиця 3.1

Характеристика показників по групах, Me (Q1; Q3)

Показник		Групи порівнянь				p
		Контроль n=95	1-а n=57	2-а n=63	3-я n=32	
Вік, роки		53,5 (44,4; 62,9)	53,0 (50,0; 56,0)	53,0 (48,0; 59,0)	59,0 (53,5; 64,0)	0,033
Тривалість захворювання, роки		0,00 (0,00; 0,00)	5,0 (2,0; 10,0)	5,0 (2,0; 8,0)	13,5 (9,5; 20,0)	0,0e-01
Стать*	чоловіки	37 (0,389)	22 (0,386)	24 (0,381)	11 (0,344)	0,974
	жінки	58 (0,611)	35 (0,614)	39 (0,619)	21 (0,656)	
ІТХ, ум.од.		0,00 (0,00; 0,00)	5,13 (2,86; 7,41)	5,55 (3,40; 7,50)	8,96 (7,41; 10,72)	0,0e-01
АТс, мм рт. ст.		140 (127; 146)	130 (130; 145)	140 (130; 150)	140 (132; 150)	0,225
АТд, мм рт. ст.		91 (84; 95)	85 (80; 90)	90 (80; 95)	90 (80; 90)	0,018

Примітка. p – статистична значущість розбіжностей між групами для кількісних показників згідно до критерія Н і для якісних (позначені *) – χ^2

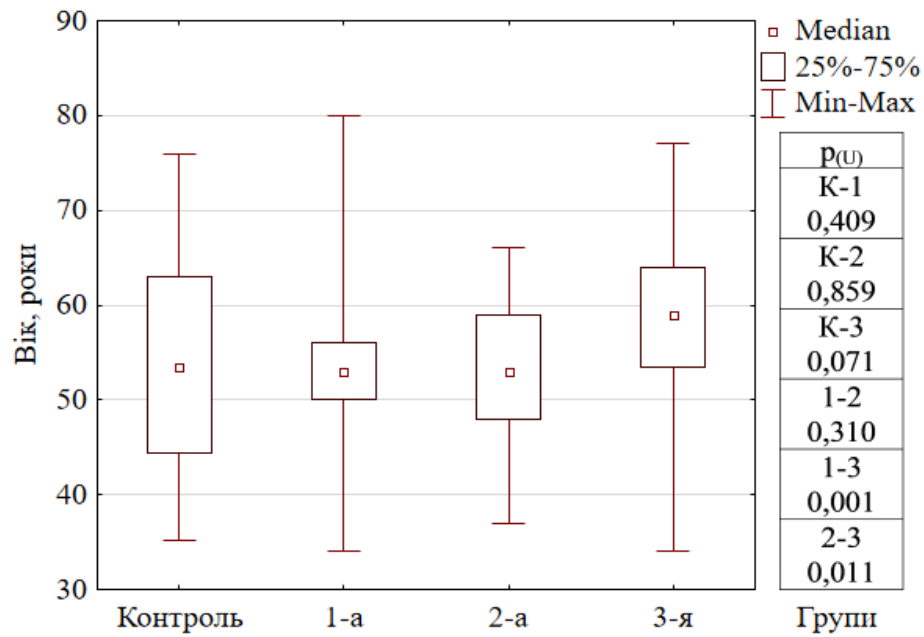


Рис. 3.1. Вік (роки) пацієнтів по групам.

Відповідно, й тривалість захворювання у хворих 3-ї групи склала 13,5 років (рис. 3.2), тоді як у 1-й і 2-й групах – по 5,0 років ($p < 0,001$). Отже, хворі з тяжким ступенем на час залучення у програму дослідження були на 6 років старшими та довше (на 8,5 років) страждали на ЦД2Т.

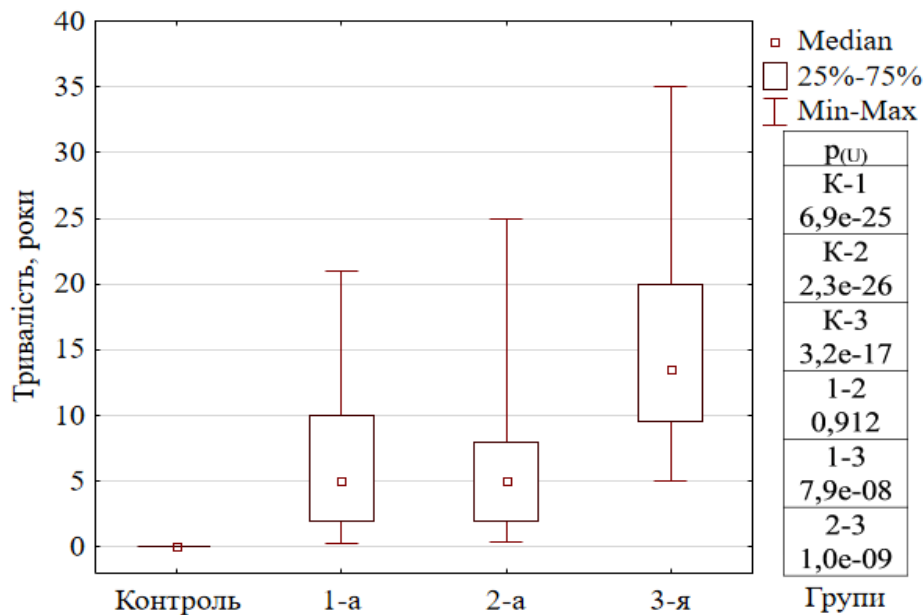


Рис. 3.2. Тривалість захворювання на ЦД2Т (роки) по групам.

Такий результат вказував з одного боку, на взаємозалежність ТЗ і віку, а, з іншого, – на наявність привертаючих факторів у хворих 3-ї групи. До таких факторів можуть бути віднесені спосіб життя та харчування, і, в тому числі, генетичні фактори [32]. Дані останніх років показали, що розповсюдженість ЦД2Т неухильно зростає при тому, що тривалість життя таких хворих збільшується [124]. Крім того, гіперглікемія, як основний маркер діабету, виявляється в більш ранньому віці та збільшується кількість хворих у стадії компенсації за показниками глікованого гемоглобіну (<7%).

За статтю по групах суттєвих розбіжностей виявлено не було (див. табл. 3.1 та рис. 3.3), кількість жінок у всіх групах переважала кількість чоловіків, що відповідало загальній тенденції розповсюдженості ЦД2Т [40,124].

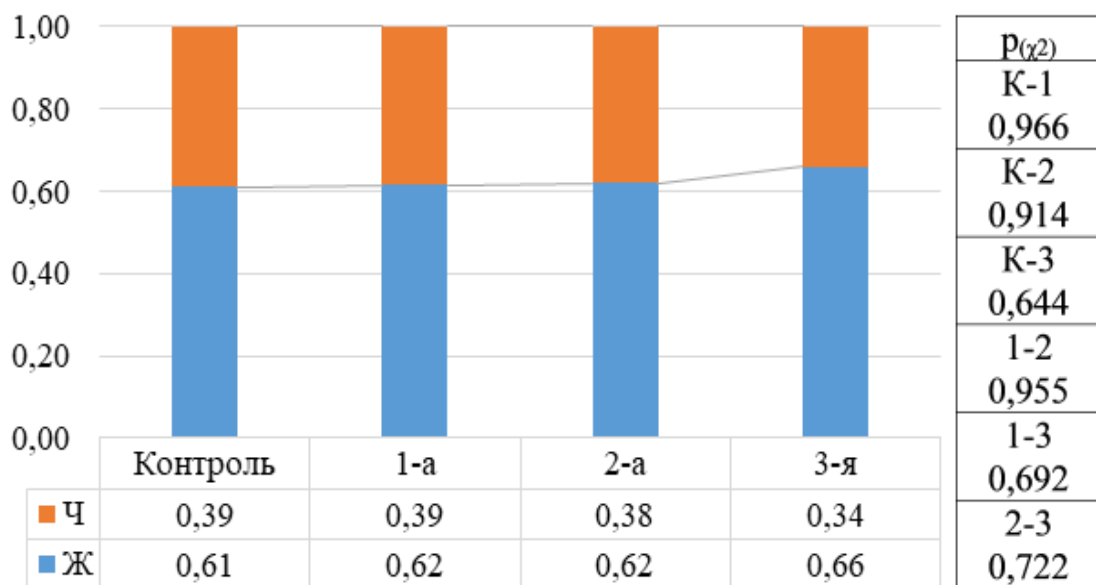


Рис. 3.3. Розподіл чоловіків (Ч) і жінок (Ж) хворих на ЦД2Т по групах.
За вертикальною віссю – частоти, за горизонтальною – групи

Нами був запропонований оригінальний індекс тяжкості хвороби – ІТХ. Величина цього індексу є відношенням сумарної ступені тяжкості діабетичних ускладнень, наявних у пацієнта, до його віку, виражене в умовних одиницях (див. формулу 2.1).

Так, наприклад, серед обстежених хворих мінімальна величина ІТХ (1,82 ум.од.) була відмічена у жінки, 55 років, яка страждала на ЦД2Т один рік і мала тільки діабетичну полінейропатію 1 ст. – СТУ=1; максимальна (17,78 ум.од.) – у чоловіка, 45 років з давністю захворювання 10 років та наявністю ретинопатії, ангіопатії нижніх кінцівок, полінейропатії, нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації – 2 ст. і артеріальної гіпертензії – СТУ=8. Отже, ІТХ зворотно залежав від віку й прямо – від наявності та ступеню ускладнень.

У хворих 1-ї та 2-ї груп (див. табл. 3.1 та рис. 3.4) ІТХ суттєво не відрізнявся (медіана склала, відповідно, 5,13 ум.од. та 5,55 ум.од.), тоді як у хворих 3-ї групи був суттєво вищим (8,96 ум.од.), що було статистично значущим ($p < 0,001$).

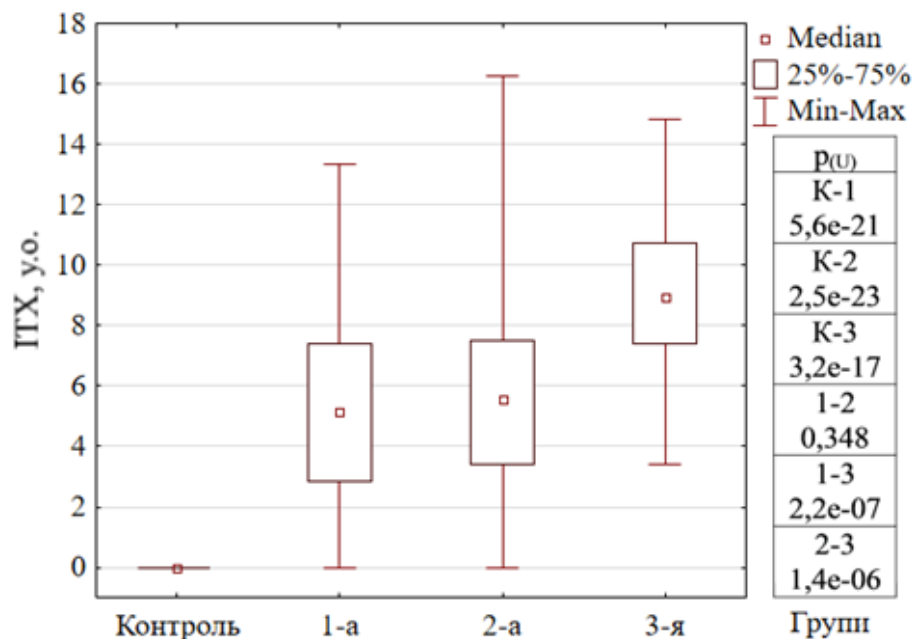


Рис. 3.4. Індекс тяжкості хвороби (ІТХ) по групам.

Величини артеріального тиску були (див. табл. 3.1 та рис. 3.5 і 3.6) вищими за умов наявності декомпенсації і ускладнень ЦД2Т у хворих 3-ї групи, що було статистично значущим для різниці величин діастолічного тиску ($p = 0,018$).

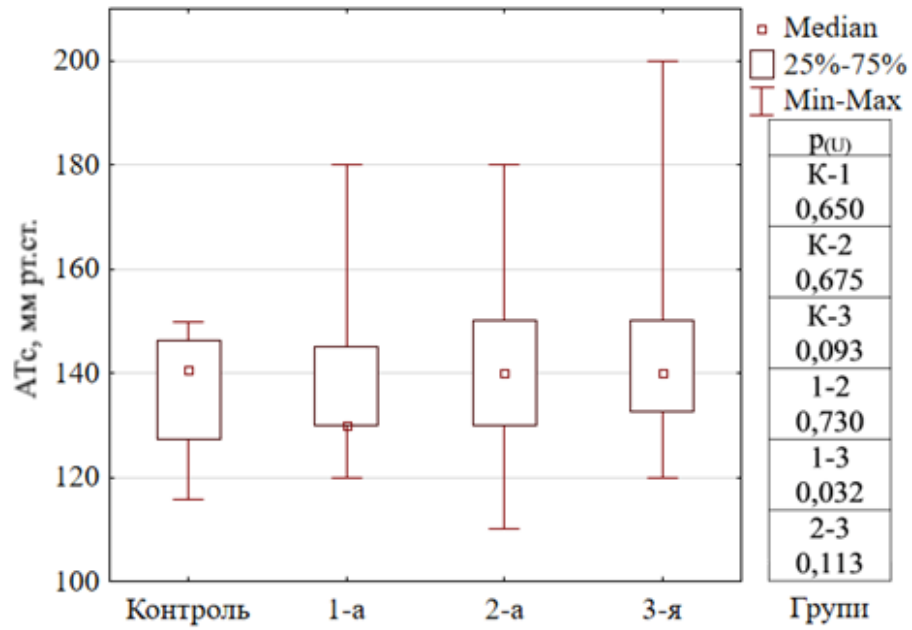


Рис. 3.5. Артеріальний тиск систолічний (АТс; мм рт. ст.) по групам.

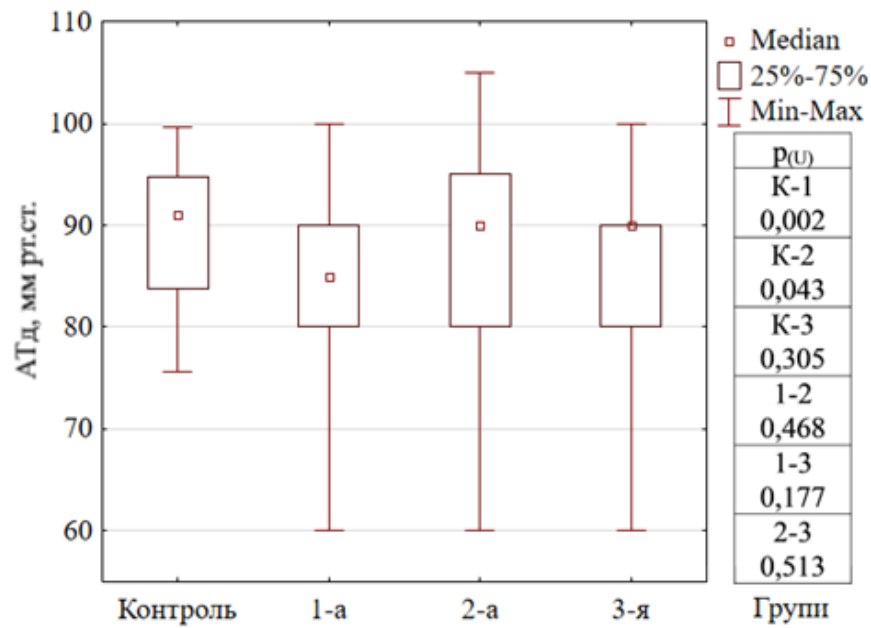


Рис. 3.6. Артеріальний тиск діастолічний (АТд; мм рт. ст.) по групам.

Враховуючи майже однакові величини тиску при статистичному аналізі, було проаналізовано кількість хворих з артеріальною гіпертензією за ступенями [37] (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Відмінності за ступенями артеріальної гіпертензії по групах

Ступінь артеріальної гіпертензії	Групи порівнянь				p(χ^2)
	Контроль, n (f)	1-а, n (f)	2-а, n (f)	3-я, n (f)	
0	42 (0,442)	32 (0,561)	40 (0,635)	9 (0,281)	3,0e-06
1	53 (0,558)	16 (0,281)	18 (0,286)	16 (0,500)	
2	0 (0,000)	6 (0,105)	5 (0,079)	3 (0,094)	
3	0 (0,000)	3 (0,053)	0 (0,000)	4 (0,125)	

Як витікало з отриманих даних, частота і ступінь артеріальної гіпертензії достеменно збільшувалася по групах хворих ($p=3,0e-06$). Так, у контрольній групі артеріальну гіпертензію мали 53 хворих (0,558), причому всі вони мали підвищення артеріального тиску 1-го ступеню. У 1-й групі – у 25 хворих мала місце артеріальна гіпертензія (0,439), причому у 16 (0,281) була 2-га ступінь і у трьох була 3-тя ступінь гіпертензії. У хворих 2-ї групи артеріальна гіпертензія була визначена у 23 хворих (0,365), тоді як у 3-й групи – у більшості хворих (0,719), причому у чотирьох хворих (0,125) – артеріальна гіпертензія була 4-го ступеню.

Показники вуглеводного обміну по групах хворих подано у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Відмінності між показниками вуглеводного обміну по групах

Показники	Групи порівнянь				p (H)
	Контроль	1-а	2-а	3-я	
Глікемія, ммоль/л	4,5 (4,0; 5,1)	11,0 (8,7; 13,7)	15,0 (12,6; 18,7)	14,9 (13,0; 16,6)	0,0e-01
HbA1C, %	5,1 (4,1; 5,9)	7,8 (7,5; 8,1)	10,0 (9,4; 10,9)	9,7 (9,3; 10,7)	0,0e-01
Інсулін, мкМЕ/мл	12,0 (7,4; 15,0)	15,4 (7,5; 22,1)	13,8 (9,5; 21,1)	6,0 (4,0; 8,6)	0,0e-01
НОМА-ІР, ум. од.	2,4 (1,3; 3,3)	6,9 (3,7; 10,7)	9,3 (6,1; 14,3)	3,8 (2,8; 5,2)	0,0e-01
НОМА-ФБК, ум.од.	148,0 (140; 160)	30,6 (16,7; 68,6)	25,2 (14,4; 36,0)	12,2 (7,0; 14,1)	0,0e-01

Рівень глікемії був достеменно вищим у хворих на ЦД2Т (рис. 3.7) та значно перевищував контроль ($p < 0,001$). Так, рівень глюкози у крові перевищував контроль у 1-й групі – у 2,4 рази ($p = 6,9e-25$), у 2-й групі – у 3,3 рази ($p = 2,1e-26$) і у 3-й групі – у 3,3 рази ($p = 3,2e-17$).

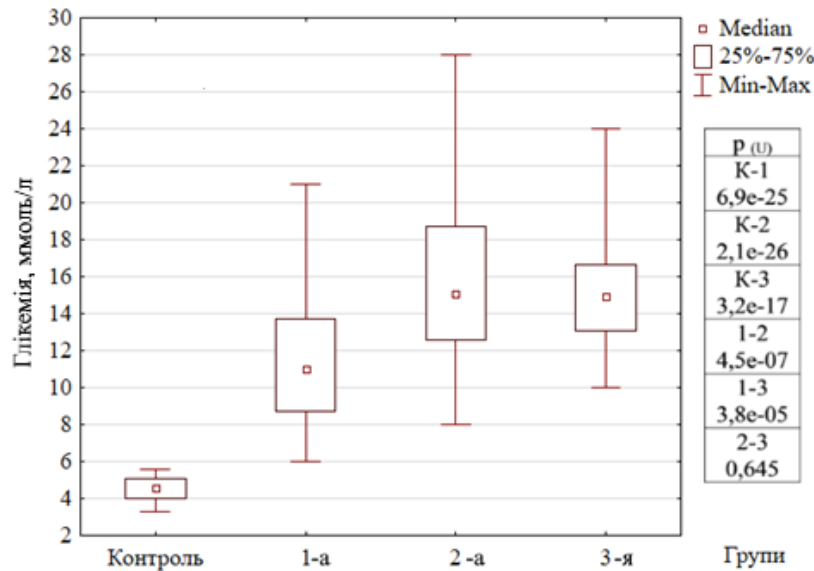


Рис. 3.7. Рівні глікемії (ммоль/л) по групам.

Таку ж динаміку мав й рівень у крові HbA1c (рис. 3.8). Його рівень у крові перевищував контроль у 1-й групі – у 1,5 рази ($p = 4,6e-24$), у 2-й групі – у 2,0 рази ($p = 8,3e-26$) і у 3-й групі – у 1,9 рази ($p = 3,2e-17$).

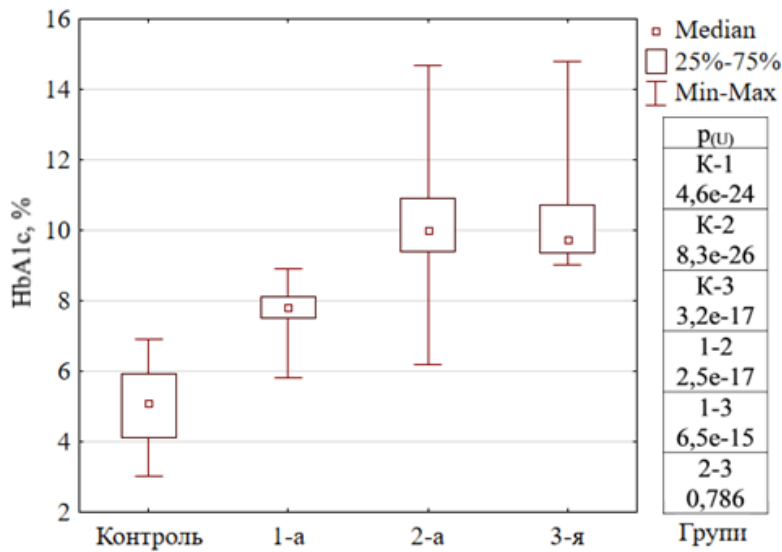


Рис. 3.8. Рівні HbA1c (%) по групам.

Загалом, розподіл хворих по групах відповідав ступеню компенсації діабету за рівнем глікемії та HbA1c за класифікацією [37] у балах (табл. 3.4).

Ступінь компенсації ЦД2Т за рівнем глікемії оцінювали за градацією від 1 до 5 балів [37,41], результати її визначення наведено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Ступінь компенсації ЦД2Т у групах

Показник	Бали	Групи порівнянь			p (χ^2)
		1-а, n (f)	2-а, n (f)	3-я, n (f)	
Ступінь компенсації за рівнем глікемії натщесерце	1	1 (0,017)	-	-	1,8e-04
	2	12 (0,211)	-	-	
	3	34 (0,596)	37 (0,587)	21 (0,656)	
	4	7 (0,123)	17 (0,270)	10 (0,313)	
	5	3 (0,053)	9 (0,143)	1 (0,031)	
Ступінь компенсації за рівнем HbA1c	1	24 (0,421)	-	-	0,0e-01
	2	33 (0,579)	-	-	
	3	-	63 (1,000)	32 (1,000)	

1-й та 2-й ступені компенсації були виявлені тільки у хворих 1-ї групи. 3-й ступінь – відносно однаково розподілився у хворих всіх груп, причому більшість хворих мала саме 3-й ступінь компенсації за рівнем глюкози. 4-й і 5-й ступінь – частіше виявлялися у хворих 2-ї та 3-ї груп. Виявлені розбіжності, в цілому, мали статистичну значущість ($p=1,8e-04$).

Загальноновизнаним методом оцінки компенсації ЦД2Т є й рівень у крові HbA1c; за даними [25,33,39,41] тільки 33% хворих на ЦД2Т мають компенсований рівень HbA1c ($<7\%$). Як наведено у таблиці 3.3 та на рис. 3.9, хворі 1-ї групи мали рівень у крові HbA1c з медіанним значенням $7,8\%$ (I-й і III-й квартилі, відповідно, $7,5\%$ і $8,1\%$).

Всі хворі 2-ї групи (див. табл. 3.3) мали некомпенсований рівень HbA1c (Me $10,0\%$; I-й і III-й квартилі, відповідно, $9,4\%$ і $10,9\%$). Також і всі хворі 3-ї групи мали високий рівень HbA1c (Me $9,7\%$; I-й і III-й квартилі, відповідно, $9,3\%$ і $10,7\%$).

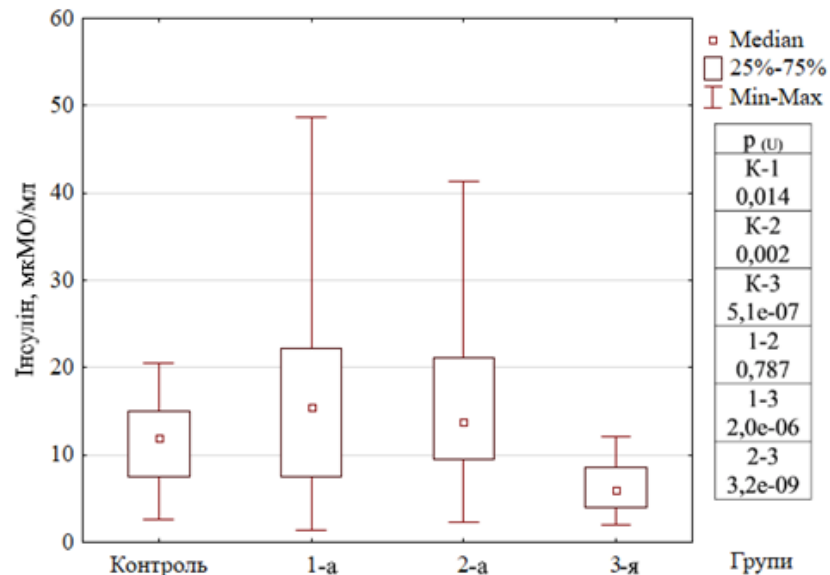


Рис. 3.9. Рівень інсуліну крові (мкМО/мл) по групам.

Отже ключова різниця для подальшої оцінки 1-ї і 2-ї груп полягала у ступені компенсації хворих з середнім ступенем тяжкості ЦД2Т. У 1-й групі всі хворі були компенсовані, тоді як у 2-й і 3-й групах – некомпенсовані.

Також було проаналізовано рівень у крові інсуліну та індекси інсулінорезистентності (див. табл. 3.3.). Рівень гормону мав тенденцію до збільшення у 1-й та 2-й групах у порівнянні з контролем (відповідно, $p=0,014$ та $p=0,002$). Це відображало розвиток гіперінсулінемії внаслідок інсулінорезистентності [40].

У хворих 3-ї групи формувалася абсолютна інсулінова недостатність – рівень інсуліну знижувався у 2,0 рази у порівнянні з контролем ($p=5,1e-0,7$).

Такі дані було підтверджено результатами визначення індексу інсулінорезистентності НОМА-ІР (рис. 3.10), який у 2-й та 3-й групах значно перевищував контрольні значення у 2,9 рази та у 3,9 рази, відповідно ($p<0,001$). У 3-й групі значення індексу теж було високим, але меншою мірою, ніж у інших групах хворих (у 1,6 рази; $p<0,001$).

Розвиток інсулярної недостатності у хворих 3-ї групи підтверджував і індекс функції бета-клітин НОМА-ФБК (у 12,1 рази; $p<0,001$; рис. 3.11). Значення індексу НОМА-ФБК прогресивно знижувалися у групах хворих

($p < 0,001$). Так, вже у 1-й групі величина індексу була знижена у 4,8 рази ($p = 3,9 \times 10^{-22}$) у порівнянні з контролем; у 2-й групі – у 5,9 рази ($p = 4,2 \times 10^{-24}$) і у 3-й групі – у 12,1 рази ($p = 3,2 \times 10^{-17}$). Достеменною була різниця й між групами.

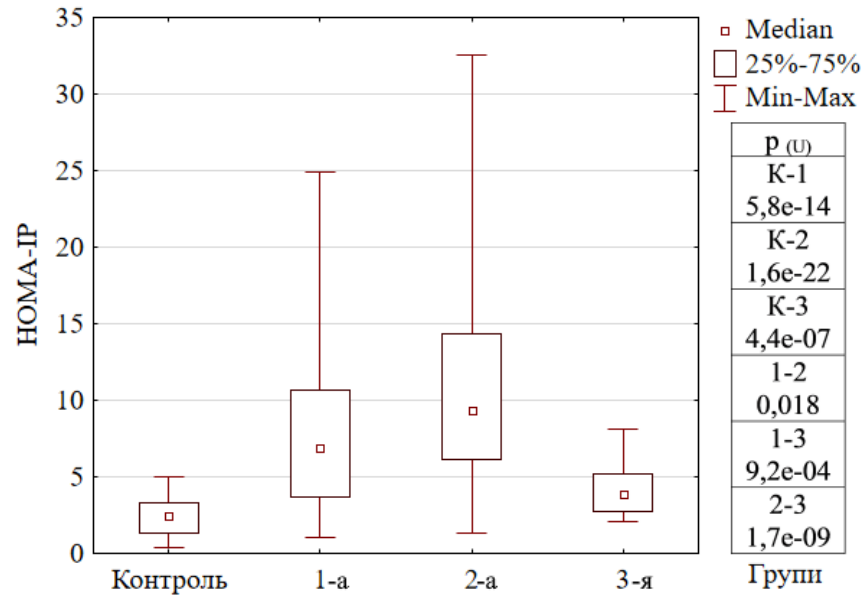


Рис. 3.10. Індекс НОМА-ІР по групах.

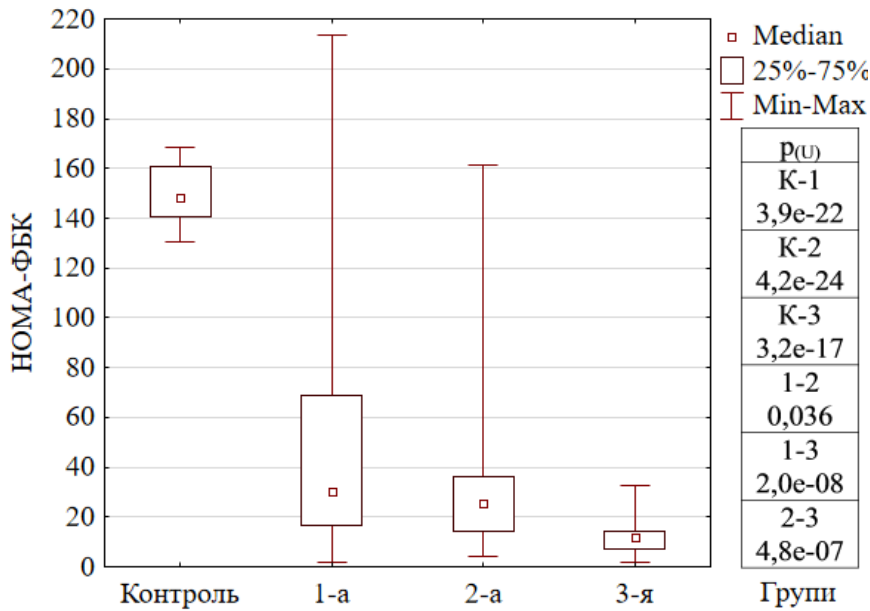


Рис. 3.11. Індекс НОМА-ФБК по групах.

Показники, що відображали функцію нирок по групах хворих, надано у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Відмінності між показниками функції нирок у групах хворих

Показники	Групи порівнянь				p(H)
	Контроль (n=95)	1-а (n=57)	2-а (n=63)	3-я (n=32)	
Сечовина, ммоль/л	4,67 (3,41; 6,73)	5,92 (4,60; 7,20)	6,50 (5,30; 7,30)	7,61 (6,15; 8,90)	0,0e-01
Креатинін, мкмоль/л	66,4 (57,9; 78,2)	84,0 (75,0; 90,0)	80,3 (72,0; 95,0)	92,2 (77,5; 118)	0,0e-01
Діурез, л	1,30 (1,14; 15,3)	2,00 (1,70; 2,00)	2,00 (2,00; 2,00)	2,00 (1,70; 2,00)	0,0e-01
Швидкість клубочкової фільтрації, мл/мін.	109,0 (97,6; 113,0)	93,5 (78,0; 108)	88,6 (72,2; 103)	75,8 (49,4; 91,4)	0,0e-01
Глюкозурія, г/л	0,23 (0,11; 0,34)	1,29 (0,00; 15,4)	5,51 (3,00; 13,2)	5,65 (0,00; 15,6)	0,0e-01
Альбумінурія, мг/на добу	18,6 (13,1; 24,0)	56,9 (30,7; 90,0)	76,5 (45,5; 90,3)	101,0 (72,6; 146)	0,0e-01

Рівні і сечовини, і креатиніну у крові по групах збільшувалися ($p < 0,001$), що відображало розвиток нефропатії. Діурез збільшувався, що відображало розвиток діабетичної поліурії. Швидкість клубочкової фільтрації, відповідно, знижувалася, та була найнижчою у хворих 3-ї групи (у 1,4 рази; $p < 0,001$). Розвиток нефропатії також підтверджувало збільшення рівнів глюкозурії і альбумінурії (див. табл. 3.5), які сягали максимальних значень в 2-й і 3-й групах ($p < 0,001$).

Частота хворих з нефропатією за показниками швидкості клубочкової фільтрації і альбумінурії, яку діагностували за критеріями [37] наведено у табл. 3.6. Як за показниками швидкості клубочкової фільтрації, так і за альбумінурією кількість хворих з нефропатією зростала по групах, що було максимально виражено у 3-й групі. Так, за показниками швидкості клубочкової фільтрації частота хворих з нефропатією у 1-й групі склала 0,421, у 2-й групі – 0,508, у 3-й групі – 0,687 ($p = 0,006$). Крім того, тільки у 3-й групі були наявні двоє хворих з 3-м ступенем нефропатії за цим показником

(0,062). Також і за рівнем альбумінурії частота хворих з нефропатією зростала і склала у 1-й групі 0,755, у 2-й групі – 0,842 і у 3-й групі – 0,969 ($p=0,038$).

Таблиця 3.6

Кількість і частоти хворих з різним ступенем нефропатії у групах хворих

Показник	Ступінь	Групи порівнянь			$p(\chi^2)$
		1-а, n (f)	2-а, n (f)	3-я, n (f)	
Діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації	0	33 (0,579)	31 (0,492)	10 (0,313)	0,006
	1	20 (0,351)	27 (0,429)	12 (0,375)	
	2	4 (0,070)	5 (0,079)	8 (0,250)	
	3	0 (0,000)	0 (0,000)	2 (0,062)	
	4	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	
Діабетична нефропатія за альбумінурією	0	14 (0,245)	10 (0,159)	1 (0,031)	0,038
	1	40 (0,702)	50 (0,794)	26 (0,813)	
	2	3 (0,053)	3 (0,048)	5 (0,156)	

Показники жирового обміну наведено у табл. 3.7. Вміст холестерину та ліпопротеїнів низької щільності по групах суттєво не відрізнявся ($p>0,05$), тоді як вміст тригліцеридів (рис. 3.12) був вищим за контрольний у хворих всіх груп з максимумом у 3-ї групі (у 1,5 рази; $p<0,05$).

Таблиця 3.7

Відмінності між показниками жирового обміну та ІМТ по групах

Показники	Групи порівнянь				p (H)
	Контроль (n=95)	1-а (n=57)	2-а (n=63)	3-я (n=32)	
Холестерин, ммоль/л	5,4 (4,9; 6,3)	5,4 (4,5; 6,2)	5,3 (4,4; 5,7)	5,4 (4,6; 5,9)	0,512
Ліпопротеїни низької щільності, г/л	3,5 (2,5; 4,6)	2,8 (2,2; 4,6)	2,5 (1,5; 3,4)	3,1 (1,5; 3,7)	0,060
Тригліцериди, ммоль/л	1,3 (0,8; 2,0)	1,8 (1,1; 2,3)	1,5 (1,3; 3,0)	2,0 (1,3; 3,0)	0,002
ІМТ, кг/м ²	26,5 (24,6; 29,9)	29,0 (25,6; 31,9)	30,1 (26,8; 34,3)	35,0 (28,4; 35,0)	0,0e-01
Лептин, нг/мл	12,3 (9,0; 15,8)	32,3 (23,8; 43,9)	41,5 (28,8; 56,5)	66,1 (39,6; 88,8)	0,0e-01

Отже, майже всі хворі 3-ї групи мали зайву вагу або ожиріння (розкид значень склав від 28,4 кг/м² до 35,0 кг/м²).

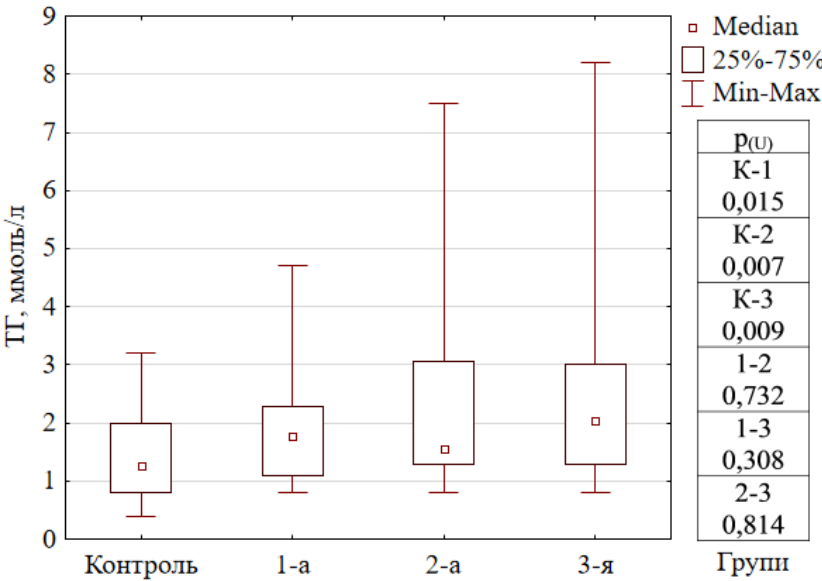


Рис. 3.12. Рівень тригліцеридів (ТГ) у крові (ммоль/л) по групам.

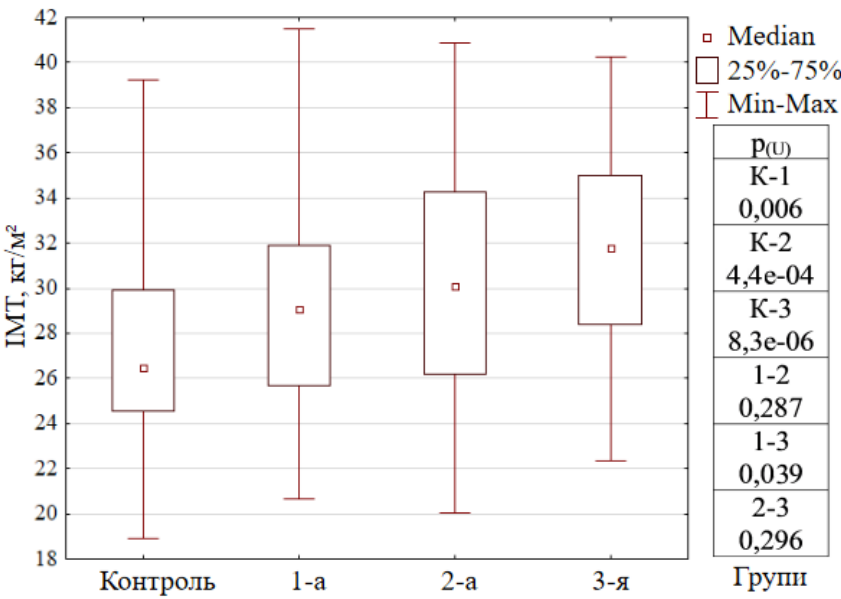


Рис. 3.13. ІМТ (кг/м²) по групам.

Загальновідомий зв’язок ожиріння з ЦД2Т [40,41], ця закономірність показана і у нашому дослідженні, причому – саме для хворих 3-ї групи, тобто – за наявності декомпенсації та багатьох ускладнень. Крім того, за нашими

результатами ожиріння у хворих на ЦД2Т можна зв'язати з високим рівнем у крові тригліцеридів.

Одним з механізмів, що сприятиме ожирінню у хворих на ЦД2Т, є лептинорезистентність. У наших дослідженнях рівень лептину (рис. 3.14) поступово збільшувався по групах, сягаючи максимуму у 3-й групі.

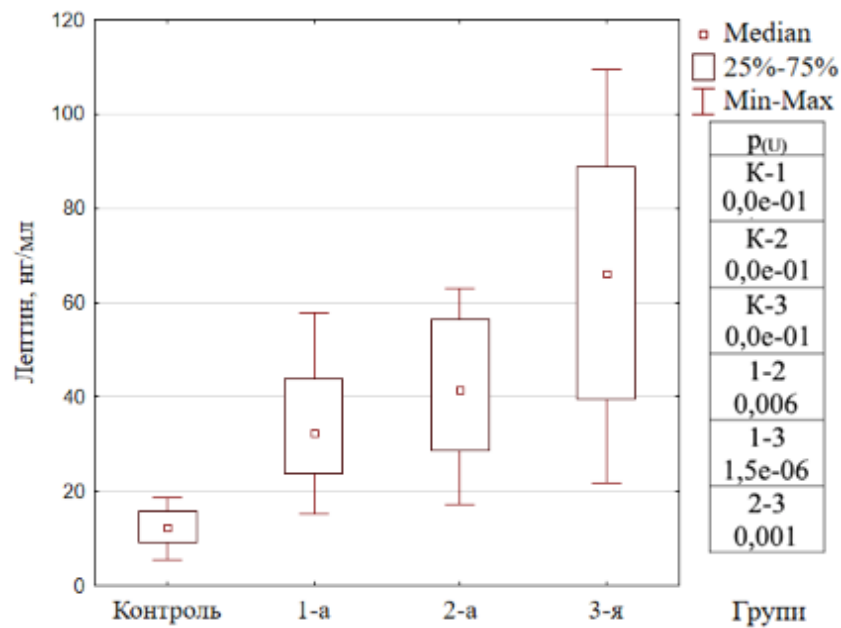


Рис. 3.14. Рівень лептину у крові (нг/мл) по групах.

Так, у 1-й групі рівень у крові гормону перевищував контрольний у 2,6 рази, у 2-й групі – у 3,4 рази і у 3-й групі – у 5,4 рази (для всіх порівнянь $p < 0,001$). Ці дані підтвердили закономірність, що була виявлена у хворих [24,254]: встановлено, що при ЦД2Т розвивається феномен лептинорезистентності, при якому гіперлептинемія, що прямо залежить від об'єму жирової тканини, супроводжується втратою фізіологічних властивостей гормону та вносить істотний внесок у формування і прогресування ожиріння, ангіопатії та інсулінорезистентності.

Частота інших ускладнень за їх ступенем у хворих по групах наведена у табл. 3.8. Ступінь діабетичної ретинопатії оцінювалася за критеріями [37]: непроліферативна – 1-ша ступінь, препроліферативна – 2-га ступінь і проліферативна – 3-тя ступінь. У хворих 1-ї групи ретинопатія була тільки 1-

го ступеню (0,649), у 2-й групі – 1-го і 2-го ступеню (разом 0,778) і у 3-й групі – всі хворі мали ретинопатію, у тому числі четверо (0,125) – ретинопатію 3-го ступеню. Отже по групах мала місце прогресія частоти і ступеню ретинопатії ($p=2,0e-06$).

Таблиця 3.8

Кількість і частоти ускладнень різного ступеню у групах хворих

Показник	Ступінь	Групи порівнянь			p (χ^2)
		1-а, n (f)	2-а, n (f)	3-я, n (f)	
Ступінь діабетичної ретинопатії	0	20 (0,351)	13 (0,263)	0 (0,000)	2,0e-06
	1	37 (0,649)	33 (0,524)	21 (0,656)	
	2	0 (0,000)	16 (0,254)	7 (0,219)	
	3	0 (0,000)	1 (0,016)	4 (0,125)	
Ступінь діабетичної полінейропатії	0	7 (0,123)	10 (0,159)	1 (0,031)	0,001
	1	40 (0,702)	50 (0,794)	27 (0,844)	
	2	10 (0,175)	3 (0,048)	1 (0,031)	
	3	0 (0,000)	0 (0,000)	3 (0,094)	
Наявність макроангіопатії нижніх кінцівок	0	57 (1,000)	64 (1,000)	0 (0,000)	0,0e-01
	1	0 (0,000)	0 (0,000)	32 (1,000)	

Таж сама тенденція біла відмічена й у відношенні діабетичної полінейропатії. У хворих 1-ї і 2-ї груп це ускладнення мало 1-й і 2-й ступінь (відповідно, разом 0,877 і 0,842), у хворих 3-ї групи – всі хворі (крім одного) мали полінейропатію (0,969). Отже, по-перше, полінейропатія була дуже розповсюджена у обстежених хворих, а, по-друге, по групах мала місце прогресія частоти і ступеню цього ускладнення ($p=0,001$).

Щодо діабетичної макроангіопатії нижніх кінцівок, то таке ускладнення було характерно тільки для хворих 3-ї групи і не зустрічалось у хворих інших двох груп.

У всіх хворих при госпіталізації виконували манжеткову пробу РЛК [46,205,206] (табл. 3.9).

Пробу проводили шляхом накладання манжетки тонометра на плече пацієнта. Це неспецифічний метод виявлення схильності до кровотечі при різних захворюваннях (тромбоцитарно-судинних порушеннях, скарлатині, кору, грипі, хронічних захворюваннях нирок, артеріальної гіпертензії) і, у тому числі – як чинник ЕДФ при діабетичній ангіопатії.

Таблиця 3.9

Частота позитивних результатів манжеткової проби РЛК по групах

Бали	Групи, n (f)				χ^2	p
	Контроль	1-а	2-а	3-я		
1	95 (1,000)	8 (0,140)	5 (0,079)	0 (0,000)	282,27	0,0e-01
2	0 (0,000)	19 (0,333)	27 (0,429)	0 (0,000)		
3	0 (0,000)	22 (0,386)	23 (0,365)	8 (0,250)		
4	0 (0,000)	8 (0,140)	8 (0,127)	24 (0,750)		

Всі пацієнти контрольної групи мали результат проби не більше 10 петіхій (1 бал). Хворі 1-ї і 2-ї груп мали різні результати, більшість з яких (0,72 і 0,80, відповідно) були у межах 2-3-х балів (кількість петіхій від 11 до 49); розподіл частоти випадків у цих групах між собою не відрізнявся ($p=0,612$). 4 бали (кількість петіхій більше 50) у хворих цих груп було отримано з відносно невеликою частотою – 0,14 і 0,13, відповідно. У хворих 3-ї групи з переважною частотою (0,75) реєструвалося 4 бали, у решти хворих (0,25) було отримано 3 бали. Розподіл пацієнтів у 4-й групі достеменно відрізнявся від контролю, 2-ї і 3-ї груп ($p<0,001$).

На наш погляд, такі результати відображали зростання ступеню ЕДФ у хворих за групами і відображали тяжкість перебігу ЦД2Т: кількість хворих з максимальним балом суттєво зростала від 1-ї групи до 3-ї.

Цікавим був результат про те, що навіть при компенсованому ЦД2Т середнього ступеню (1-а група) більш ніж половина хворих (52,6 %) мали 3

або 4 бали. Це нашоувхувало на припущення, що ЕДФ, навіть при однаковій клінічній та лабораторній картині захворювання, може мати різне вираження – від негативної до різко позитивної.

Таку особливість необхідно було враховувати при подальших дослідженнях для визначення ролі окремих патогенетичних чинників у розвитку ЕДФ. Результат манжеткової проби РЛК у балах можна вважати напівкількісним показником тяжкості ЕДФ.

3.2. Структура ускладнень цукрового діабету 2-го типу у залежності від його тяжкості

Аналіз структури ускладнень наведений на рис. 3.15. Найчастішим ускладненням була сенсорна полінейропатія, яка була виявлена у 88,1 % хворих. Також високою була розповсюдженість нефропатії (84,2 %) та ретинопатії (78,3 %). Артеріальна гіпертензія була виявлена у 46,7 % хворих, а макроангіопатія нижніх кінцівок – у 21,0 %.

У таблиці 3.10 наведені дані по розподілу частот ускладнень по групах хворих та результати порівнянь за наявністю або відсутністю ускладнень в групах. Статистично значущими виявилися різниці за розподілом частот ретинопатії, полінейропатії, нефропатії за альбумінурією та макроангіопатії нижніх кінцівок (для всіх порівнянь $p < 0,001$). По групах значуще відрізнялися частоти розподілу ретинопатії ($p = 5,8 \times 10^{-4}$), нефропатії за альбумінурією ($p = 0,032$), макроангіопатії нижніх кінцівок ($p < 0,001$) та артеріальної гіпертензії ($p = 0,004$).

У зв'язку з отриманням таких результатів, далі було зроблено спробу визначити вплив ускладнень та ступеню їх вираженості на тяжкість стану хворого, тобто – на наявність його в той чи іншій групі. Для відбору приймали порівняння при $p < 0,05$; ВШ \neq 0; ВІ – не повинен включати 0,00.

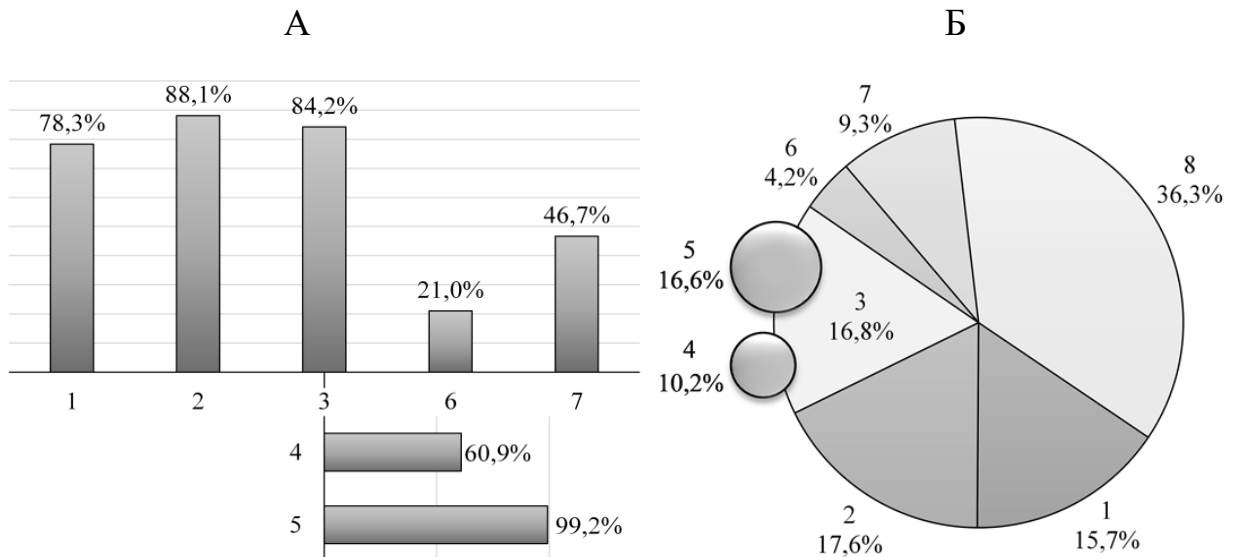


Рис. 3.15. Розподіл діабетичних ускладнень у обстежених хворих (А) і серед загальної кількості ускладнень (Б):

- 1 – ретинопатія;
- 2 – сенсорна полінейропатія;
- 3 – нефропатія;
- 4 – нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації (швидкість клубочкової фільтрації менш ніж 90 мл/хв.);
- 5 – нефропатія за альбумінурією (рівень альбумінурії більше 30 мкг/л);
- 6 – макроангіопатія нижніх кінцівок;
- 7 – артеріальна гіпертензія;
- 8 – інші, або немає

На відношення хворого до 1-ї групи у порівнянні з іншими групами мали значення наявності полінейропатії 2-го ступеню ($\chi^2=7,57$; $p=0,006$; ВШ=4,84; 95% ВІ 1,44-16,26) і нефропатії за альбумінурією ($\chi^2=4,39$; $p=0,036$; ВШ=2,49; 95% ВІ 1,04-5,94), а також відсутності ретинопатії ($\chi^2=9,60$; $p=0,002$; ВШ=3,41; 95% ВІ 1,53-7,58) і макроангіопатії нижніх кінцівок ($\chi^2=24,32$; $p=1,0e-06$; ВШ=max; 95% ВІ N/A-max).

Для 2-ї групи у порівнянні з іншими групами – наявності ретинопатії 2-го ступеню ($\chi^2=8,83$; $p=0,003$; ВШ=3,99; 95% ВІ 1,53-10,39) та відсутності

макроангіопатії нижніх кінцівок ($\chi^2=28,69$; $p<0,001$; ВШ=max; 95% ВІ N/A-max) і артеріальної гіпертензії ($\chi^2=4,49$; $p=0,034$; ВШ=2,04; 95% ВІ 1,05-3,49).

Таблиця 3.10

Розподіл частот діабетичних ускладнень по групах

Ускладнення	-/+	Порівняння за -/+			Порівняння за групами (n=152)				
		n (f)	χ^2	p	1-а n (f)	2-а n (f)	3-я n (f)	χ^2	p
Ретинопатія	-	33 (0,217)	95,1	0,0e-01	20 (0,132)	13 (0,085)	0 (0,000)	14,9	5,8e-04
	+	119 (0,783)			37 (0,243)	50 (0,329)	32 (0,211)		
Полінейропатія	-	18 (0,118)	174,0	0,0e-01	7 (0,046)	10 (0,066)	1 (0,006)	3,3	0,190
	+	134 (0,882)			50 (0,329)	53 (0,349)	31 (0,204)		
Нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації	-	74 (0,487)	0,12	0,731	33 (0,217)	31 (0,204)	10 (0,066)	5,8	0,054
	+	78 (0,513)			24 (0,351)	32 (0,429)	22 (0,375)		
Нефропатія за альбумінурією	-	25 (0,164)	132,2	0,0e-01	14 (0,092)	10 (0,066)	1 (0,007)	6,9	0,032
	+	127 (0,836)			43 (0,283)	53 (0,349)	31 (0,204)		
Макроангіопатія нижніх кінцівок	-	120 (0,789)	99,6	0,0e-01	57 (0,375)	63 (0,414)	0 (0,000)	152,0	0,0e-01
	+	32 (0,211)			0 (0,000)	0 (0,000)	32 (0,211)		
Артеріальна гіпертензія	-	81 (0,533)	1,07	0,302	32 (0,211)	40 (0,263)	9 (0,059)	11,0	0,004
	+	71 (0,467)			25 (0,165)	23 (0,151)	23 (0,151)		

Для 3-ї групи – наявність ретинопатії 3-го ступеню ($\chi^2=10,81$; $p=0,001$; ВШ=17,00; 95% ВІ 1,83-158,05), макроангіопатії нижніх кінцівок ($\chi^2=152,00$; $p<0,001$; ВШ=max; 95% ВІ N/A-max); нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації 2 ступеню ($\chi^2=7,79$; $p=0,005$; ВШ=4,11; 95% ВІ 1,44-11,74), артеріальної гіпертензії 3 ступеню ($\chi^2=5,75$; $p=0,016$; ВШ=5,57; 95% ВІ 1,18-

26,23).

Резюме. Хворі з тяжким ступенем ЦД2Т (3-я група) під час залучення до програми дослідження були на 6 років старшими за віком та довше (на 8,5 років) хворіли: тривалість захворювання на час залучення до програми дослідження у хворих 3-ї групи склала 13,5 років, тоді як у 1-й і 2-й групах по 5,0 років ($p < 0,001$). Запропоновано оригінальний індекс тяжкості хвороби (ІТХ), величина якого відображала тяжкість перебігу ЦД2Т прямо залежала від кількості та тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта. Частота і ступінь артеріальної гіпертензії достеменно збільшувалася по групам хворих ($p = 5,2 \times 10^{-5}$). Всі хворі мали гіпеглікемію, причому 1-й та 2-й ступені компенсації були виявлені тільки у хворих 1-ї групи. 3-й ступінь – відносно однаково розподілився у хворих всіх груп. 4-й і 5-й ступінь – частіше виявлялися у хворих 2-ї та 3-ї груп ($p = 1,8 \times 10^{-4}$). Ключова різниця для подальшої оцінки 1-ї і 2-ї груп полягала у ступені компенсації хворих з середнім ступенем тяжкості: у 1-й групі всі хворі були компенсовані, тоді як у 2-й і 3-й групах – некомпенсовані. У хворих 1-ї і 2-ї груп мала місце гіперінсулінемія, у хворих 3-ї групи – гіпоінсулінемія та зниження функції бета клітин; у хворих всіх груп була наявна інсулінорезистентність. Вміст у крові сечовини і креатиніну збільшувалися ($p < 0,001$), що відображало розвиток нефропатії; також була наявна діабетична поліурія; рівні глюкозурії і альбумінурії сягали максимальних значень в 2-й і 3-й групах ($p < 0,001$). Майже всі хворі 3-ї групи мали зайву вагу або ожиріння (ІМТ від 28,4 кг/м² до 35,0 кг/м²), що можна було зв'язати з гіпертригліцеридемією. Показано, що при ЦД2Т розвивається феномен лептинорезистентності і гіперлептинемії. Серед ускладнень найчастішою була сенсорна полінейропатія (88,1 % хворих). Також високою була розповсюдженість нефропатії (84,2 %) та ретинопатії (78,3 %). Артеріальна гіпертензія була виявлена у 46,7 % хворих, а макроангіопатія нижніх кінцівок – у 21,0 %. По групах значуще відрізнялися частоти розподілу ретинопатії ($p = 5,8 \times 10^{-4}$),

нефропатії за альбумінурією ($p=0,032$), макроангіопатії ніжних кінцівок ($p<0,001$) та артеріальної гіпертензії ($p=0,004$).

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступних публікацій [19, 23].

РОЗДІЛ 4

ХАРАКТЕРИСТИКА ЧИННИКІВ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ

4.1. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2-го типу

Узагальнені дані чинників ЕДФ в залежності від тяжкості захворювання наведено у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Відмінності між чинниками ЕДФ по групах

Показники	Групи порівнянь				p (H)
	Контроль (n=95)	1-а (n=57)	2-а (n=63)	3-я (n=32)	
ET1, фмоль/мл	0,55 (0,40; 0,75)	2,01 (1,87; 2,29)	2,44 (2,10; 2,80)	2,61 (2,09; 3,05)	<0,001
NOx, мкмоль/л	4,35 (4,08; 4,61)	6,00 (5,69; 6,34)	6,69 (6,29; 7,10)	6,06 (5,99; 6,71)	<0,001
eNOS, пг/мл	364 (333; 390)	288 (232; 358)	231 (185; 254)	193 (166; 239)	<0,001
TNF α , пг/мл	22,3 (16,2; 29,0)	93,3 (70,1; 104,7)	113,0 (90,5; 124,0)	145,0 (102; 230)	<0,001
ДК, Од./мл	2,06 (1,67; 2,24)	4,70 (4,39; 5,17)	5,62 (5,48; 5,87)	4,77 (4,05; 5,24)	<0,001

За вмістом у крові ET1 спостерігалася чітка тенденція до його збільшення по групам: з 0,55 фмоль/мл у контролі до 2,61 фмоль/мл у 3-й групі (рис. 4.1). Статистичний аналіз показав, що всі відмінності були статистично значущими ($p < 0,001$), крім різниці рівнів ET1 у 2-й та 3-й групах ($p = 0,206$). Отже, було встановлено, що рівень ET1 у групах хворих на ЦД2Т статистично значуще перевищував контроль (у 3,7-4,7 рази). З розвитком захворювання, в цілому, відмічена тенденція до більш високих значень ET1, але для середнього та важкого ступенів достеменної різниці встановлено не було.

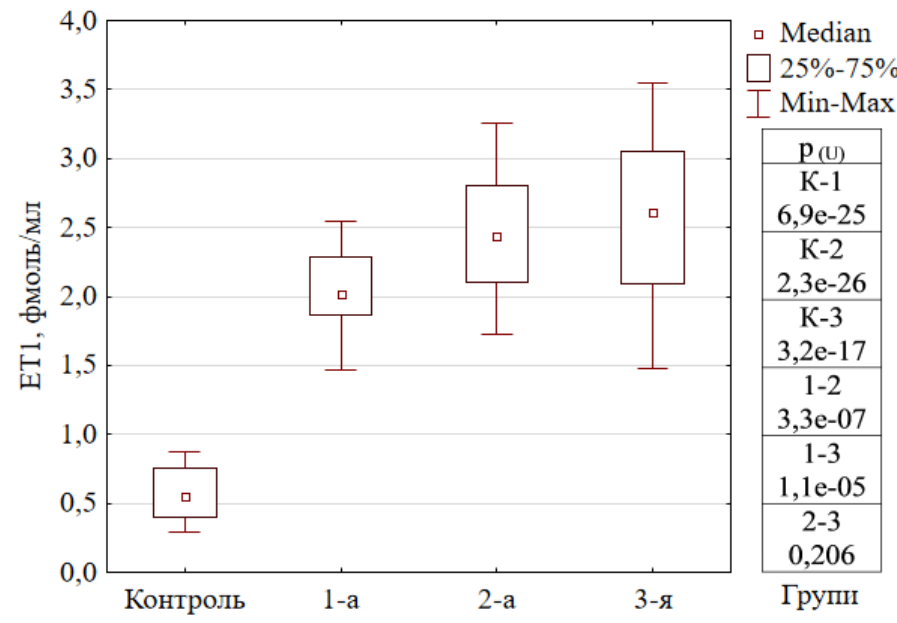


Рис. 4.1. Вміст у крові ET1 (фмоль/мл) по групам.

Вміст у крові стабільних метаболітів NO (нітратів і нітритів) визначених за NOx (див. табл. 4.1 та рис. 4.2) зростав по групам хворих у порівнянні з контролем (у 1,4-1,5 рази), що, в цілому, мало високу статистичну значущість ($p < 0,001$). Найбільшого рівня він сягав у 2-й групі – у 1,5 рази ($p = 2,3e-26$). Разом із тим, між 1-ю та 3-ю групами достеменно різниця не виявлена ($p = 0,581$).

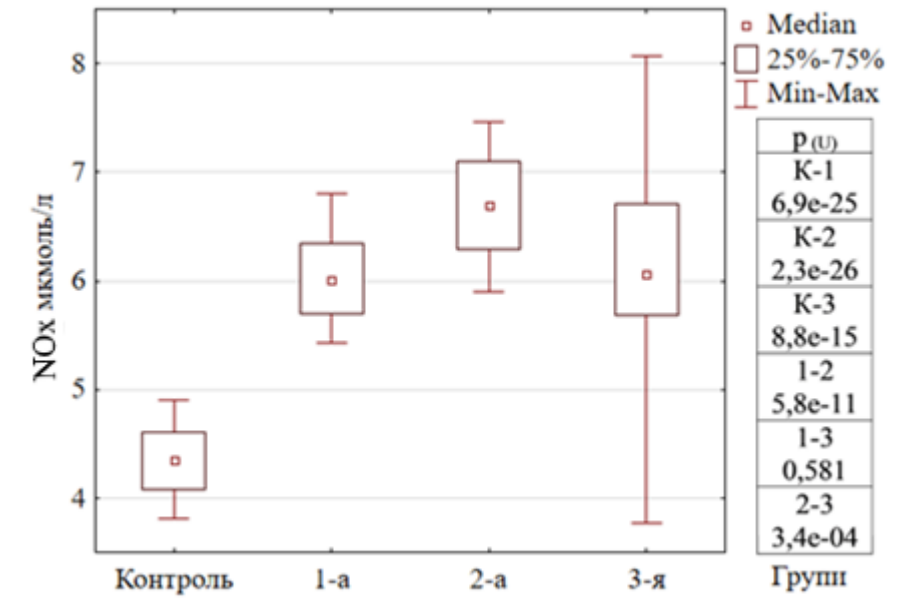


Рис. 4.2. Вміст у крові NOx (мкмоль/л) по групам.

Отже можна було вважати, що рівень NOx при ЦД2Т збільшувався, що не залежало від тяжкості захворювання.

Як свідчили дані таблиці 4.1, вміст у крові eNOS був нижчим по групам хворих у порівнянні з контролем (у 1,3-1,9 рази; $p < 0,001$), причому найнижчим він був у 3-й групі (рис. 4.3).

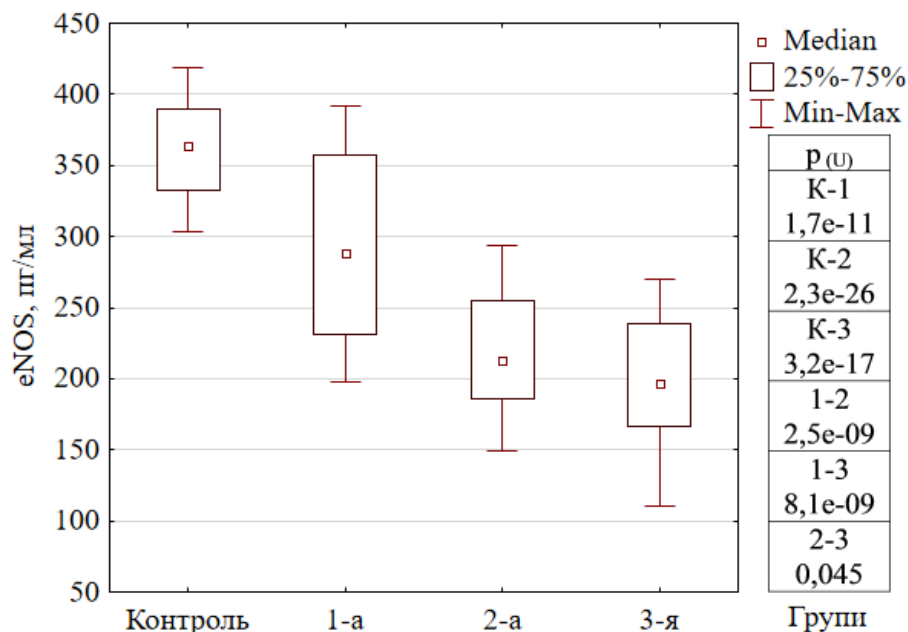


Рис. 4.3. Вміст у крові eNOS (пг/мл) по групам.

Наявність статистично значущої різниці між всіма групами підтвердило зв'язок між розвитком ЦД2Т і вмістом у крові eNOS. Вочевидь, що із збільшенням тяжкості діабету відбувалося наростаюче гальмування експресії eNOS та прогресивне зниження її рівня у крові, що співпадало з даними [157]. За думкою М. Banerjee і Р. Vats (2014) зменшення eNOS можна розглядати як біомаркер окисного стресу [54]. Навіть, біохімічні сполуки, які посилюють продукування NO з eNOS, можна розглядати як нові терапевтичні підходи для запобігання або зворотного судинного ушкодження, викликаного окислювальним стресом [104].

Вміст у крові одного з основних прозапальних інтерлейкинів – TNF α багаторазово підвищувався, особливо – у 3-й групі (у 6,5 рази), також була наявною і досить висока статистична значущість розбіжностей між групами

(див. табл. 4.1 та рис. 4.4).

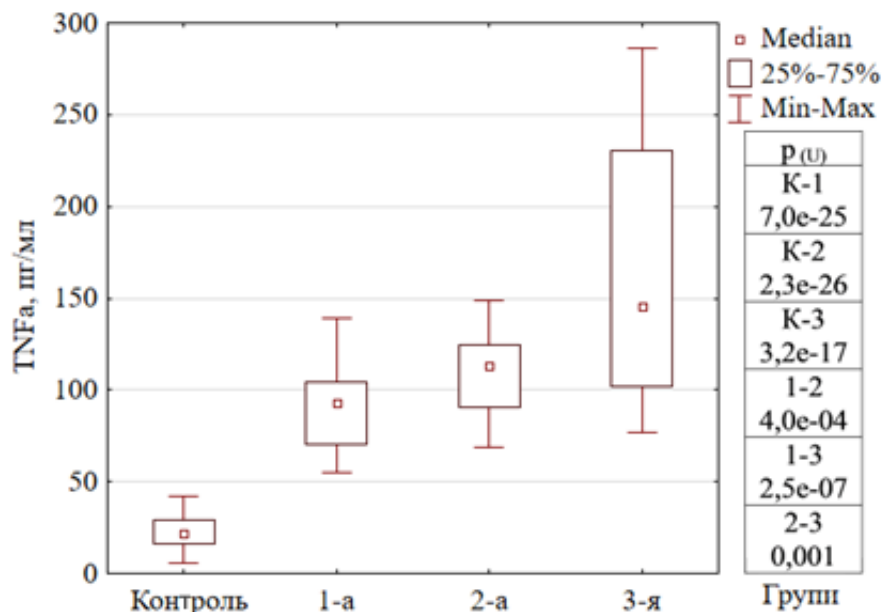


Рис. 4.4. Вміст у крові $\text{TNF}\alpha$ (пг/мл) по групам.

Вміст $\text{TNF}\alpha$ перевищав контроль у 1-й і 2-й групах, відповідно, у 4,2 і 5,1 рази. Переважно високі значення $\text{TNF}\alpha$ згрупувалися у 3-й групі, що показувало залежність активації цитокінового каскаду від тяжкості ЦД2Т, та узгоджувалося з літературними даними [59,148].

Останнім показником, обраним для характеристики ЕДФ був загальний рівень у крові ДК. Роль цього чинника, як ключового параметру інтенсифікації перекісного окислення ліпідів при ЦД2Т була показана S.V. Ziablitsev et al. (2016) [253]. Причому, ДК, як і малоновий діальдегід, прогресивно накопичувався у крові протягом перших п'яти років захворювання на ЦД2Т, після чого лишався на стабільно високому рівні. Аналогічну тенденцію ми отримали і у даному дослідженні (див. табл. 4.1 та рис. 4.5): у всіх групах вміст у крові ДК був суттєво збільшеним (у 2,3-2,7 рази; $p < 0,001$).

При порівнянні між групами, було встановлено відсутність статистично значущої різниці між 1-ю і 3-ю групами ($p = 0,385$), тоді як рівень ДК був значуще більшим у 2-й групі ($p < 0,001$).

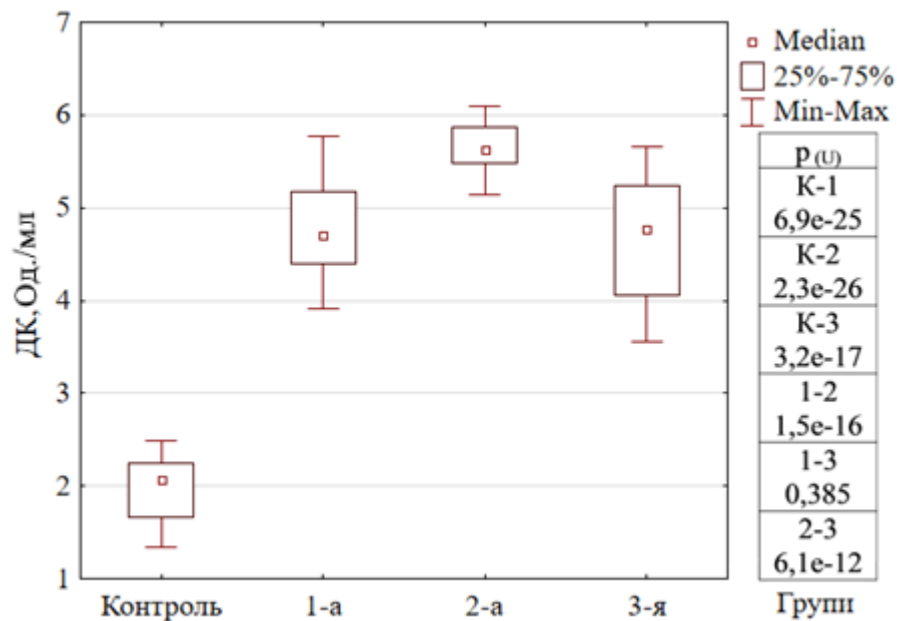


Рис. 4.5. Вміст у крові ДК (Од./мл) по групам.

Таким чином, були встановлені певні закономірності розвитку ЕДФ при збільшенні тяжкості ЦД2Т. Рівні у крові ET1, NOx, TNF α та ДК багаторазово достеменно збільшувалися, що, в цілому, відповідало ступеню тяжкості патологічного процесу, особливо для TNF α . Вміст у крові eNOS – знижувалися згідно до тяжкості патологічного процесу.

Для з'ясування впливу чинників ЕДФ на клініко-лабораторні показники було виконано серію однофакторних регресійних аналізів із застосуванням пакета GRM. У якості предикторів були обрані чинники ЕДФ (перелік див. у табл. 4.1), у якості залежних змінних – дані хворих (вік, стать, ступінь компенсації, тяжкість, наявність, вид та ступень ускладнень, вид терапії, результати лабораторних досліджень; загалом – 51 показник).

Для ET1 (табл. 4.2) найбільший вплив виявлено у відношенні глікемії ($F=8,431$; $p=0,008$) і ступеню компенсації ЦД по HbA1c ($F=8,322$; $p=0,008$).

Також виявлений досить сильний вплив на ступінь компенсації діабету по глікемії ($F=4,832$; $p=0,037$) і результати проби манжетової проби РЛК ($F=7,541$; $p=0,011$). Відмічений вплив ET1 на ступінь нефропатії за альбумінурією ($F=7,011$; $p=0,014$) та рівень самої альбумінурії ($F=5,524$; $p=0,027$). З інших чинників ЕДФ, ET1 мав зворотній зв'язок з eNOS ($F=17,33$;

$p=0,001$) та прямий – з ДК ($F=11,93$; $p=7,2e-04$).

Таблиця 4.2

Вплив ET1 на клініко-лабораторні показники (тільки значущі впливи)

Показник	Для регресійних рівнянь				Для β -коефіцієнтів		
	R	R ²	F	p	$\beta \pm SE$	t	p
Глікемія	0,502	0,252	8,431	0,008	$3,583 \pm 1,234$	2,904	0,008
Ступінь компенсації за HbA1c	0,500	0,25	8,322	0,008	$0,717 \pm 0,248$	2,885	0,008
Манжеткова проба РЛК	0,481	0,232	7,541	0,011	$0,988 \pm 0,360$	2,746	0,011
Ступінь нефропатії за альбумінурією	0,468	0,219	7,011	0,014	$0,353 \pm 0,133$	2,648	0,014
Альбумінурія	0,425	0,181	5,524	0,027	$39,29 \pm 16,716$	2,35	0,027
Ступінь компенсації за глікемією	0,402	0,162	4,832	0,037	$0,582 \pm 0,264$	2,198	0,037
eNOS	0,322	0,103	17,33	0,001	$-43,82 \pm 10,52$	-4,163	5,3e-05
ДК	0,271	0,074	11,93	7,2e-04	$0,379 \pm 0,110$	3,455	7,2e-04

Отже приріст вмісту у крові ET1 обумовлював високу глікемію, альбумінурію та підвищував ступінь декомпенсації діабету і ступінь діабетичної нефропатії.

Для NOx (табл. 4.3) прослідковано зв'язки з віком хворих ($F=7,005$; $p=0,014$) та ступенем нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($F=5,672$; $p=0,025$), а також – з низкою біохімічних маркерів: рівнями у крові тригліцеридів ($F=10,443$; $p=0,003$), сечовини ($F=5,813$; $p=0,024$) та креатиніну ($F=4,356$; $p=0,047$).

То, що NOx зворотно були пов'язаний з швидкістю клубочкової фільтрації ($F=4,536$; $p=0,043$) пояснювало такі зв'язки. З чинників ЕДФ, NOx були сильно пов'язані з TNF α ($F=30,15$; $p=1,7e-07$) і ДК ($F=34,08$; $p=3,2e-08$). Отже, можна вважати, що накопичення у крові NOx, в першу чергу, пов'язане із зниженням швидкості клубочкової фільтрації та погіршенням функції нирок.

Таблиця 4.3

Вплив NO на клініко-лабораторні показники (тільки значущі впливи)

Показник	Для регресійних рівнянь				Для β -коефіцієнтів		
	R	R ²	F	p	$\beta \pm SE$	t	p
Вік	0,468	0,219	7,005	0,014	4,496 \pm 1,699	2,647	0,014
Тригліцериди	0,543	0,295	10,443	0,003	1,134 \pm 0,351	3,232	0,003
Сечовина	0,434	0,189	5,813	0,024	1,128 \pm 0,468	2,411	0,023
Ступінь нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації	0,430	0,185	5,672	0,025	0,412 \pm 0,173	2,382	0,025
Швидкість клубочкової фільтрації	0,392	0,154	4,536	0,043	-11,70 \pm 5,50	-2,130	0,043
Креатинін	0,385	0,148	4,356	0,047	12,82 \pm 6,14	2,087	0,047
TNF α	0,409	0,167	30,15	1,7e-07	29,13 \pm 5,31	5,491	1,7E-07
ДК	0,430	0,185	34,08	3,2E-08	0,43 \pm 0,07	5,848	3,2E-08

Для eNOS (табл. 4.4) вагомий вплив виявлено у відношенні рівня HbA1c (F=8,951; p=0,006), ступеню компенсації діабету за HbA1c (F=17,567; p<0,001), ступеню нефропатії за рівнем альбумінурії (F=5,749; p<0,024) і ступенем діабетичної полінейропатії (F=5,498; p<0,027), результатів манжеткової проби РЛК (F=5,671; p=0,025).

Таблиця 4.4

Вплив eNOS на клініко-лабораторні показники (тільки значущі впливи)

Показник	Для регресійних рівнянь				Для β -коефіцієнтів		
	R	R ²	F	p	$\beta \pm SE$	t	p
Ступінь компенсації за HbA1c	0,642	0,413	17,567	<0,001	-0,006 \pm 0,001	-4,191	3,0e-04
HbA1c	0,513	0,264	8,951	0,006	-0,014 \pm 0,004	-2,992	0,006
Ступінь нефропатії за альбумінурією	0,432	0,187	5,749	0,024	-0,002 \pm 0,001	-2,398	0,025
Проба РЛК	0,43	0,185	5,671	0,025	-0,006 \pm 0,003	-2,381	0,025
Ступінь полінейропатії	0,425	0,18	5,498	0,027	-0,003 \pm 0,001	-2,345	0,028
ET1	0,322	0,103	17,33	5,3e-05	-0,002 \pm 0,001	-4,163	5,3e-05
TNF α	0,161	0,026	4,00	0,047	-0,118 \pm 0,059	-2,000	0,047

З інших чинників ЕДФ, від'ємні зв'язки відмічено для ET1 ($F=17,33$; $p=5,3e-05$) і $TNF\alpha$ ($F=4,00$; $p=0,047$). Отже, вплив зниження рівню eNOS відображався у зниженні компенсації діабету за HbA1c, прогресуванні нефро- і полінейропатії.

Для $TNF\alpha$ (табл. 4.5) виявлено вплив на тривалість захворювання ($F=7,674$; $p=0,01$), ступінь нефропатії ($F=11,298$; $p=0,002$), макроангіопатії нижніх кінцівок ($F=14,034$; $p=0,001$), ретинопатії ($F=7,545$; $p=0,011$), швидкості клубочкової фільтрації ($F=9,606$; $p=0,005$), результати проби РЛК ($F=9,352$; $p=0,005$), низку метаболічних показників (HbA1c, тригліцериди, сечовина, креатинін; для всіх $p<0,001$) та рівень альбумінурії ($F=4,609$; $p=0,042$).

Таблиця 4.5

Вплив $TNF\alpha$ на клініко-лабораторні показники (тільки значущі впливи)

Показник	Для регресійних рівнянь				Для β -коефіцієнтів		
	R	R^2	F	p	$\beta \pm SE$	t	p
Сечовина	0,801	0,642	44,835	0,0e-01	0,033 \pm 0,004	6,700	1,0e-06
Креатинін	0,715	0,511	26,171	0,0e-01	0,377 \pm 0,074	5,116	2,8e-05
Наявність макроангіопатії нижніх кінцівок	0,600	0,360	14,034	0,001	0,005 \pm 0,001	3,746	0,001
Ступінь нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації	0,558	0,311	11,298	0,002	0,008 \pm 0,002	3,361	0,002
Швидкість клубочкової фільтрації	0,527	0,278	9,606	0,005	-0,249 \pm 0,080	-3,099	0,005
Проба РЛК	0,522	0,272	9,352	0,005	0,011 \pm 0,003	3,058	0,005
Тривалість захворювання	0,485	0,235	7,674	0,01	0,055 \pm 0,020	2,770	0,001
Ступінь ретинопатії	0,481	0,232	7,545	0,011	0,005 \pm 0,002	2,747	0,011
Тригліцериди	0,452	0,204	6,41	0,018	0,015 \pm 0,006	2,532	0,006
HbA1c	0,446	0,199	6,202	0,020	0,018 \pm 0,007	2,49	0,019
Альбумінурія	0,395	0,156	4,609	0,042	0,361 \pm 0,168	2,147	0,042

Продовження таблиці 4.5

Показник	Для регресійних рівнянь				Для β -коефіцієнтів		
	R	R ²	F	p	$\beta \pm SE$	t	p
NO _x	0,409	0,167	30,15	1,7e-07	0,006 \pm 0,001	5,491	1,7e-07
eNOS	0,161	0,026	4,002	0,047	-0,220 \pm 0,110	-2,000	0,047
ДК	0,338	0,114	19,326	2,1e-05	-0,005 \pm 0,001	-4,396	2,1e-05

З інших чинників ЕДФ, TNF α мав щільні прямі зв'язки з NO_x (F=30,15; p=1,7e-07) та ДК (F=19,326; p=2,1e-05) і зворотній зв'язок з eNOS (F=4,002; p=0,047). Отже, TNF α комплексно впливав на майже всі ключові показники ЦД2Т, що проявлялось синергічно з іншими чинниками ЕДФ.

Для ДК (табл. 4.6) виявлені зв'язки із тривалістю хвороби (F=9,173; p=0,006) та наявністю макроангіопатії нижніх кінцівок (F=9,885; p=0,004). Цікавим було виявлення впливу на рівень у крові інсуліну (F=9,361; p=0,005), результати проби РЛК (F=8,132; p=0,009) та рівень інсулінорезистентності – індекс НОМА-ІР (F=9,372; p=0,005).

Таблиця 4.6

Вплив ДК на клініко-лабораторні показники (тільки значущі впливи)

Показник	Оцінювання за регресійним рівнянням				Оцінювання за β -коефіцієнтом		
	R	R ²	F	p	$\beta \pm SE$	t	p
Наявність макроангіопатії нижніх кінцівок	0,532	0,283	9,885	0,004	-0,333 \pm 0,106	-3,144	0,004
Інсулін	0,522	0,272	9,361	0,005	5,961 \pm 1,948	3,040	0,005
НОМА-ІР	0,522	0,273	9,372	0,005	4,990 \pm 1,630	3,061	0,005
Тривалість захворювання	0,518	0,268	9,173	0,006	-3,968 \pm 1,310	-3,029	0,006
Проба РЛК	0,495	0,245	8,132	0,009	-0,682 \pm 0,239	-2,852	0,008
НОМА-QUICKI	0,424	0,180	5,483	0,027	-0,054 \pm 0,023	-2,342	0,027
МАУ	0,415	0,172	5,211	0,031	-25,74 \pm 11,27	-2,283	0,031
ЕТ-1	0,271	0,074	11,935	7,2e-04	0,194 \pm 0,056	3,455	7,2e-04
NO _x	0,430	0,185	34,08	3,2e-08	0,432 \pm 0,074	5,838	3,2e-08
TNF α	0,338	0,114	19,33	2,1e-05	-24,15 \pm 5,49	-4,396	2,1e-05

Синергізм патологічного впливу з іншими чинниками ЕДФ підтвердило наявність позитивного зв'язку з ET1 ($F=11,935$; $p=7,2e-04$), NOx ($F=34,08$; $p=3,2e-08$) та TNF α ($F=19,33$; $p=2,1e-05$).

Отже, як і TNF α , ДК визначав тяжкість та ускладнення ЦД2Т та мав синергічну дію з іншими чинниками ЕДФ.

Для окремої оцінки взаємних впливів чинників ЕДФ було побудовано схему (рис. 4.6). ET1 та NOx були прямо зв'язаними з рівнем ендогенної пероксидації (ДК); NOx – з рівнем запалення (TNF α), тоді як активність eNOS пригнічувалася ET1 та TNF α .

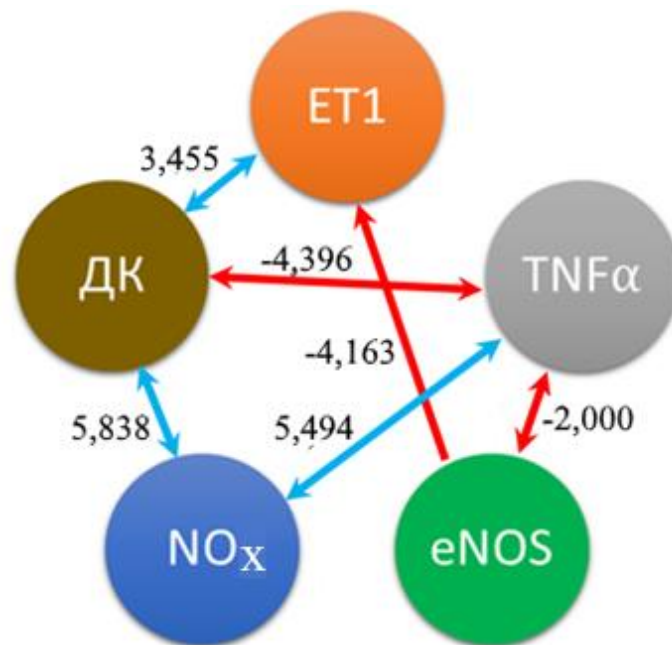


Рис. 4.6. Взаємні впливи чинників ЕДФ за результатами однофакторного регресійного аналізу.

Цифрами позначені коефіцієнти t , які демонстрували відмінності β -коефіцієнтів регресійних рівнянь від нульової гіпотези ($p<0,05$ в усіх випадках). Для позначення зв'язку між чинниками використані стрілки: червоні – негативний, блакитні – позитивний зв'язок.

4.2. Вплив чинників ендотеліальної дисфункції на розвиток ускладнень

Конкретні механізми розвитку судинних ускладнень та їх патогенетичні чинники на даний момент висвітлено недостатньо, не ясно чому у одному випадку у хворого прогресує ретинопатія, а у другому, в такого ж за клініко-лабораторними показниками хворого, прогресує нефропатія [53,194]. Саме для з'ясування патогенетичної ролі основних чинників, що відображають розвиток ЕДФ, була зроблена спроба у рамках одного дослідження розрахувати вплив таких чинників на розвиток судинних ускладнень ЦД2Т. Для вирішення цього завдання була виконана серія багатофакторних логістичних регресійних обчислень з використанням пакета GLZ. В якості залежних змінних були використані біноміальні показники, які визначали наявність або відсутність діабетичних ускладнень, а в якості незалежних (предикторів) – безперервні кількісні значення рівнів у крові чинників ЕДФ: ET1, NOx, eNOS, TNF α і ДК (див. табл. 2.4.). Для кожної залежної змінної проводили: відбір предикторів вплив яких на розвиток ускладнень статистично відрізнявся від нульової гіпотези; оцінку адекватності моделі за характеристиками ROC-діаграми; знаходження адекватної точки відсікання за ймовірнісною шкалою розвитку ускладнень і класифікаційну оцінку моделі.

У таблиці 4.7 наведені відібрані коефіцієнти регресії і вільні показники та їх статистична значущість, які були використані для побудови регресійних рівнянь прогнозу розвитку діабетичних ускладнень.

На наявність ретинопатії сильно впливав рівень у крові ET1 ($\beta=2,711$; $p=3,7e-05$), а також – TNF α ($\beta=0,012$; $p=0,037$). На наявність макроангіопатії нижніх кінцівок сильно впливали рівень в крові NOx ($\beta=7,352$; $p=1,09e-04$) і рівень в крові TNF α ($\beta=-0,140$; $p=5,84e-05$). Наявність від'ємного знаку свідчила про оборотну залежність, тобто високий рівень TNF α запобігав розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок.

Таблиця 4.7

**Результати розрахунку β -коефіцієнтів регресійних рівнянь для
відібраних предикторів та вільного показника**

Змінні регресії		$\beta \pm SE$	Wald	p
залежна	предиктори			
Наявність ретинопатії	ET1	2,711 \pm 0,657	17,022	3,7e-05
	TNF α	0,012 \pm 0,005	4,339	0,037
	Вільний показник	-5,873 \pm 1,536	0,181	1,30e-04
Наявність макроангіопатії нижніх кінцівок	NOx	7,352 \pm 1,900	14,972	1,09e-04
	TNF α	-0,140 \pm 0,035	16,155	5,84e-05
	Вільний показник	-29,731 \pm 8,512	12,201	4,78e-04
Наявність полінейропатії	ET1	1,661 \pm 0,683	5,912	0,015
	Вільний показник	-1,639 \pm 0,450	4,330	0,040
Наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації	ET1	2,312 \pm 0,476	23,564	1,21e-06
	TNF α	0,013 \pm 0,004	9,882	0,002
	Вільний показник	-6,757 \pm 1,270	28,302	1,04e-07
Наявність нефропатії за альбумінурією	ET1	4,352 \pm 1,019	18,230	1,96e-05
	eNOS	-0,011 \pm 0,005	4,903	0,027
	ДК	-1,893 \pm 0,535	12,526	4,01e-04
	Вільний показник	5,090 \pm 0,849	4,749	0,031
Наявність артеріальної гіпертензії	ET1	1,634 \pm 0,426	14,721	1,25e-04
	NOx	-1,370 \pm 0,413	10,990	0,001
	TNF α	0,018 \pm 0,005	11,003	0,001
	Вільний показник	2,775 \pm 0,225	4,750	0,033

Для полінейропатії значущим виявився тільки один чинник – ET1 ($\beta=1,661$; $p=0,015$). На наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації впливали рівні у крові ET1 ($\beta=2,312$; $p=1,21e-06$) і TNF α ($\beta=0,013$; $p=0,002$). Розвитку нефропатії за альбумінурією сприяли ET1 ($\beta=4,352$; $p=1,96e-05$) та два чинники – eNOS і ДК, які мали від’ємні знаки регресії, тобто знижували ступень нефропатії (відповідно, $\beta=-0,011$; $p=0,027$ і $\beta=-$

1,893; $p=4,01e-04$). На наявність артеріальної гіпертензії впливали ET1 ($\beta=1,634$; $p=1,25e-04$) і TNF α ($\beta=0,018$; $p=0,001$). Від'ємний коефіцієнт регресії показав чинник NOx ($\beta=-1,370$; $p=0,001$).

Такі результати дозволили зробити деякі узагальнення. По-перше, обрані чинники ЕДФ мали різний вплив на розвиток ускладнень ЦД2Т. Так, ET1 прямо впливав на розвиток всіх ускладнень (крім мікроангіопатії нижніх кінцівок). Отже, його можна було вважати ключовим для розвитку діабетичних судинних ускладнень. Серед інших чинників, було відмічено TNF α , який мав вплив на розвиток ретинопатії, нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації і артеріальної гіпертензії. Накопичення у крові NOx сприяло розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок.

По-друге, у відношенні деяких чинників ЕДФ було відмічено від'ємні значення коефіцієнтів регресії. Так приріст у крові TNF α , був зворотно зв'язаний із ступенем макроангіопатії нижніх кінцівок; рівень ДК – із ступенем нефропатії за альбумінурією, а рівень NOx – із ступенем артеріальної гіпертензії. Останній факт можна пояснити захисною роллю NO в розвитку артеріальної гіпертензії [49]. Впливів інших чинників, на перший погляд, здається парадоксальним. Доведено патогенетичне значення як чинників ЕДФ і TNF α , і ДК [194]. Отримані результати регресійного аналізу таку думку не підтвердили. Наявність зворотних взаємозв'язків ймовірно вказували на більш складні взаємовідносини чинників ЕДФ і потребує свого подальшого вивчення.

По-третє, звернуло на себе увагу відсутність патогенного впливу ДК на розвиток ускладнень ЦД2Т. Загальновизнаною є патогенетична роль вільнорадикального окислення і, у тому числі, ПОЛ при ЦД2Т [49,253]. Відсутність такого зв'язку, на наш погляд, відображала загальну закономірність реакції – рівень ДК збільшувався у перші п'ять років хвороби, після чого лишався на стабільно високому рівні [253]. Це могло свідчити про перебудову метаболічного гомеостазу на інший рівень, з інтенсифікацією вільнорадикального окислення.

Таким чином розроблені рівняння для логістичних регресійних моделей прогнозування розвитку ускладнень мали такий вигляд:

Для ймовірності розвитку ретинопатії ($P_{(РП)}$):

$$P_{(РП)} = 1/(1+e^{-(5,873+2,711*ET1+0,012*TNF\alpha)}) \quad (4.1),$$

де $ET1$ – вміст в крові ендотеліну-1 (фмоль/мл);

$TNF\alpha$ – вміст в крові фактора некрозу пухлин (пг/мл).

Для ймовірності розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок ($P_{(МАНК)}$):

$$P_{(МАНК)} = 1/(1+e^{-(29,731+7,352*NOx-0,140*TNF\alpha)}) \quad (4.2),$$

де NOx – вміст в крові стабільних метаболітів NO (мкмоль/л);

$TNF\alpha$ – вміст в крові фактора некрозу пухлин (пг/мл).

Для ймовірності розвитку полінейропатії ($P_{(ПНП)}$):

$$P_{(ПНП)} = 1/(1+e^{-(1,639+1,661*ET1)}) \quad (4.3),$$

де $ET1$ – вміст в крові ендотеліну-1 (фмоль/мл).

Для ймовірності розвитку нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($P_{(НП ШКФ)}$):

$$P_{(НП ШКФ)} = 1/(1+e^{-(6,757+2,312*ET1+0,013*TNF\alpha)}) \quad (4.4),$$

де $ET1$ – вміст в крові ендотеліну-1 (фмоль/мл);

$TNF\alpha$ – вміст в крові фактору некрозу пухлин (пг/мл).

Для ймовірності розвитку нефропатії за альбуминурією ($P_{(НП АУ)}$):

$$P_{(НП АУ)} = 1/(1+e^{-(5,09+4,352*ET1-0,011*eNOS-1,893*ДК)}) \quad (4.5),$$

де $ET1$ – вміст в крові ендотеліну-1 (фмоль/мл);

eNOS – вміст в крові ендотеліальної синтази оксиду азоту (пг/мл);

ДК – вміст в крові дієнових кон'югатів, Од./мл.

Для ймовірності розвитку артеріальної гіпертензії ($P_{(AG)}$):

$$P_{(AG)} = 1/(1+e^{-(2,775+1,634*ET1-1,370*NOx+0,018*TNFa)}) \quad (4.6),$$

де ET1 – вміст в крові ендотеліну-1 (фмоль/мл);

NOx – вміст в крові стабільних метаболітів NO (мкмоль/л);

TNF α – вміст в крові фактора некрозу пухлин (пг/мл).

Результати оцінки адекватності розроблених моделей представлені в табл. 4.8. Досить високі значення AUC та показників правдоподібності при $p < 0,05$ у всіх порівняннях вказувало на адекватність побудованих моделей. Цей факт мав велике значення для розуміння механізмів виникнення судинних ускладнень при ЦД2Т. Основним механізмом виявився суттєвий приріст у крові ET1, який сягав 2,35 (1,87; 2,80) фмоль/л проти 0,55 (0,40; 0,75) фмоль/л в контролі (особи без діабету), тобто – у 4,3 рази ($p < 0,001$).

Таблиця 4.8

Оціночні показники адекватності математичних моделей прогнозування діабетичних ускладнень

Модель	AUC	-2*Log	χ^2	p
$P_{(PI)}$	0,785	152,56	6,50	0,039
$P_{(MANK)}$	0,943	65,25	87,20	0,000
$P_{(PIIP)}$	0,676	103,46	7,13	0,007
$P_{(HIP \text{ ШКФ})}$	0,789	170,84	39,77	0,000
$P_{(HIP \text{ АУ})}$	0,889	90,48	45,41	0,000
$P_{(AG)}$	0,756	178,33	31,72	6,0e-07

Такий багаторазовий приріст рівню ET1 і був патогенетичним

чинником розвитку ускладнень ЦД2Т. З іншого боку, цей чинник можна вважати прогностичним критерієм для розрахунку ймовірності виникнення ускладнень (крім макроангіопатії нижніх кінцівок).

Другим чинником ЕДФ, який виявив вплив на розвиток ускладнень, визначено $\text{TNF}\alpha$, вміст якого у хворих сягав 117,1 (70,1; 230,0) пг/мл проти 22,3 (16,2; 29,0) пг/мл, тобто – у 5,3 рази ($p < 0,001$). Вміст у крові $\text{TNF}\alpha$ мав значення для розвитку ретинопатії, нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації та артеріальної гіпертензії.

Надалі для кожного рівняння (4.1-4.6) було побудовані частотно-ймовірнісної діаграми залежності їх чутливості, специфічності і правильності від значення ймовірності та визначені точки відсічі (cut-off) при досягненні яких можна було прогнозувати розвиток того чи іншого ускладнення. При проведенні розрахунків точності моделей дані, отримані у хворих (фактичні), порівнювали з розрахованими (прогноз) за формулами (4.1-4.6).

Результати аналізу приведені в табл. 4.9. Так, для ретинопатії значення точки відсічі склало 0,730, тобто при обчисленні даних за формулою (4.1) – враховуються рівні у крові ET1 і $\text{TNF}\alpha$, при отриманні результату вище цього значення, прогноз позитивний, менше – негативний; точність прогнозу 70,4 %.

Таблиця 4.9

Класифікаційні характеристики моделей прогнозування діабетичних ускладнень по встановленим точкам відсічі

Модель	Точка відсічі	Наявність ускладнень			Відсутність ускладнень			Точність моделі, %
		Прогноз, n	Факт, n	Вірний прогноз, %	Прогноз, n	Факт, n	Вірний прогноз, %	
$P_{(PI)}$	0,730	87	119	73,11	23	33	69,70	72,37
$P_{(MANK)}$	0,259	29	33	90,62	106	120	88,33	88,81
$P_{(PIPI)}$	0,876	81	134	60,45	11	18	61,11	60,53
$P_{(HPI\text{ ШКФ})}$	0,484	57	78	73,08	51	74	68,92	71,05
$P_{(HPI\text{ АУ})}$	0,690	118	127	92,91	20	25	80,00	90,79
$P_{(AG)}$	0,486	41	71	57,74	63	81	77,78	68,42

Для макроангіопатії нижніх кінцівок (формула 4.2, враховує рівні у крові NOx і TNF α) значення точки відсічі склало 0,259; точність прогнозу 88,8 %.

Для полінейропатії (формула 4.3, враховуються рівень у крові ET1) значення точки відсічі склало 0,876; точність прогнозу 60,5 %.

Для нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації (формула 4.4, враховуються рівні у крові ET1 і TNF α) значення точки відсічі склало 0,484; точність прогнозу 70,1 %. Для нефропатії за альбумінурією (формула 4.5, враховуються рівні у крові ET1, eNOS і ДК) значення точки відсічі склало 0,690; точність прогнозу 90,8 %.

Для артеріальної гіпертензії (формула 4.6, враховуються рівні у крові ET1, NOx і TNF α) значення точки відсічі склало 0,486; точність прогнозу 68,4 %.

4.3. Критичні значення чинників ендотеліальної дисфункції для розвитку ускладнень

При дослідженні патогенетичної ролі чинників ЕДФ в розвитку діабетичних ускладнень, на наш розсуд, важливо було визначити не тільки вплив окремих чинників (що зроблено у попередньому підрозділі), але й встановити критичні (сигнальні) рівні у крові чинників, при яких цей вплив здійснювався. Такі рівні можна було б вважати діагностичними (маркерними), які б підтверджували наявність того чи іншого ускладнення.

Для вирішення цього завдання була виконана серія однофакторних логістичних регресійних обчислень з використанням пакета GLZ. В якості залежної змінної для кожного рівняння були використані біномінальні категоріальні показники наявності або відсутності того чи іншого діабетичного ускладнення. В якості факторних ознак використовували кількісні значення рівнів у крові ET1, NOx, eNOS, TNF α і ДК (див. табл. 2.4).

Дане дослідження було виконано в три етапи. На першому етапі за

допомогою регресійного аналізу оцінювали вплив кожного чинника ЕДФ на розвиток окремих діабетичних ускладнень. За результатами аналізу відбирали чинники, вплив яких на розвиток ускладнень статистично відрізнявся від нульової гіпотези і будували регресійні рівняння відповідно до загальної формули 4.7. Далі шляхом аналізу чутливості, специфічності і правильності для кожної регресійної моделі визначали оптимальне значення ймовірності, вище якої прогнозували наявність ускладнення (точка відсічі). На третьому етапі із застосуванням значень точок відсічі для кожного діабетичного ускладнення розраховували критичні концентрації чинників ЕДФ за загальною формулою 4.8.

Нижче наводяться загальні формули для регресійних рівнянь знаходження ймовірності наявності діабетичних ускладнень за змістом чинників ЕДФ в крові і розрахунку критичних рівнів чинників за значенням ймовірності (P) для відповідного ускладнення:

$$P = 1 / (1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 * MED)}) \quad (4.7),$$

де β_0 – значення вільного показника;

β_1 – β -коефіцієнт для чинника;

MED – вміст у крові відповідного чинника ендотеліальної дисфункції (ET1 в фмоль/мл, NOx в мкмоль/л, eNOS в пг/мл, TNF α в пг/мл, ДК в Од./мл).

$$MED = \frac{-\ln\left(\frac{1}{P} - 1\right) - \beta_0}{\beta_1} \quad (4.8),$$

де MED – вміст у крові відповідного чинника (ET1 в фмоль/мл, NOx в мкмоль/л, eNOS в пг/мл, TNF α в пг/мл, ДК в Од./мл);

β_0 – значення вільного показника;

β_1 – β -коефіцієнт для чинника;

P – оптимальна ймовірність розвитку ускладнення (cut-off)

Результати проведення регресійного аналізу і оцінка впливу чинників ЕДФ на розвиток ускладнень наведена у таблиці 4.10.

Таблиця 4.10

Вплив чинників ендотеліальної дисфункції на розвиток ускладнень

Наявність ускладнення:	Wald, p				
	ET1	NO _x	eNOS	TNF α	ДК
ретинопатії	16,850 4,0e-05	0,002 0,963	2,821 0,093	3,701 0,049	0,550 0,458
макроангіопатії нижніх кінцівок	10,888 9,7e-04	4,564 0,033	15,582 7,9e-05	22,116 4,1e-06	17,974 2,2e-05
полінейропатії	5,912 0,015	0,683 0,408	2,633 0,105	0,518 0,472	2,726 0,099
нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації	21,871 3,0e-06	0,032 0,857	3,655 0,056	7,054 0,007	2,504 0,113
нефропатії за альбумінурією	18,864 1,4e-05	0,119 0,730	9,945 0,002	2,171 0,141	4,355 0,037
артеріальної гіпертензії	10,652 0,001	3,932 0,049	2,766 0,096	3,899 0,042	4,619 0,032

Вміст ET1 впливав на розвиток всіх ускладнень: ретинопатії (Wald=16,850; $p=4,0e-05$), макроангіопатії нижніх кінцівок (Wald=10,888; $p=9,7e-04$), сенсорної полінейропатії (Wald=5,912; $p=0,015$), нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації (Wald=21,871; $p=3,0e-06$), нефропатії за альбумінурією (Wald=18,864; $p=1,4e-05$) і артеріальної гіпертензії (Wald=10,652; $p=0,001$).

В результаті математичного аналізу (табл. 4.11-4.15) було встановлено, що розроблені моделі мали задовільні якісні і класифікаційні характеристики прогнозування розвитку відповідних діабетичних ускладнень.

ET1 (табл. 4.11) мав прямий зв'язок з розвитком ускладнень. Якісні показники рівнянь – AUC від 0,676 до 0,827. Моделі прогнозу мали показники правильності від 50,2 % для ретинопатії до 80,3 % для нефропатії за рівнем альбумінурії. Розрахунки для всіх чинників ЕДФ проведені за

формулами (4.7) і (4.8).

Серед всіх діабетичних ускладнень, вміст NOx (див. табл. 4.10) достеменно впливав на наявність макроангіопатії нижніх кінцівок (Wald=4,564; p=0,033) і артеріальної гіпертензії (Wald=3,932; p=0,049).

Якісні показники і класифікаційні характеристики моделей за вмістом у крові NOx надані у табл. 4.12.

Таблиця 4.11

Класифікаційні характеристики і значення точок відсічі для моделей прогнозування діабетичних ускладнень за вмістом у крові ET1

Залежна змінна	β_0	β_1	AUC	Точка відсічі	Вірний позитивний прогноз, %	Вірний негативний прогноз, %	Правильність, %
P _(РП)	-4,380	2,597	0,756	0,866	51,26	49,58	50,2
P _(МАНК)	-1,639	1,661	0,676	0,221	65,62	71,67	70,0
P _(ПНП)	-4,841	2,129	0,751	0,900	50,00	50,00	50,0
P _(НП ШКФ)	-6,286	3,744	0,827	0,489	75,64	71,62	73,7
P _(НП АУ)	-3,042	1,254	0,659	0,762	81,10	76,00	80,3
P _(АГ)	-4,825	1,457	0,676	0,464	61,97	67,90	65,1

Таблиця 4.12

Класифікаційні характеристики і значення точок відсічі для моделей прогнозування діабетичних ускладнень за вмістом у крові NOx

Залежна змінна	β_0	β_1	AUC	Точка відсічі	Вірний позитивний прогноз, %	Вірний негативний прогноз, %	Правильність, %
P _(МАНК)	3,092	-0,510	0,593	0,205	53,12	50,83	51,3
P _(АГ)	2,902	-0,676	0,601	0,471	60,56	61,53	61,5

Моделі прогнозу мали задовільні показники позитивного і негативного прогнозів (від 50,8 % до 61,5 %) та правильність на рівні 51,3 % для макроангіопатії нижніх кінцівок та – 80,3 % для артеріальної гіпертензії при

задовільній якості – AUC від 0,593 до 0,601.

Вміст eNOS (див. табл. 4.10) впливав на наявність макроангіопатії нижніх кінцівок (Wald=15,582; $p=7,9e-05$) і нефропатії за рівнем мікроальбумінурії (Wald=9,945; $p=0,002$).

Якісні і класифікаційні характеристики моделей за вмістом eNOS надано у табл. 4.13. Моделі прогнозу мали задовільні показники позитивного і негативного прогнозів (від 61,4 % до 65,6 %) та правильність на рівні 63,8 % для макроангіопатії нижніх кінцівок та – 61,8 % для нефропатії за рівнем альбумінурії і якості моделі – AUC від 0,655 до 0,742.

Таблиця 4.13

Класифікаційні характеристики і значення точок відсічі для моделей прогнозування діабетичних ускладнень за вмістом у крові eNOS

Залежна змінна	β_0	β_1	AUC	Точка відсічі	Вірний позитивний прогноз, %	Вірний негативний прогноз, %	Правильність, %
$P_{(МАНК)}$	4,254	-0,010	0,655	0,216	65,63	63,33	63,8
$P_{(НП\text{ АУ})}$	2,860	-0,019	0,742	0,852	61,42	64,00	61,8

Вміст TNF α (див. табл. 4.10) прямо впливав на наявність ретинопатії (Wald=3,701; $p=0,049$), макроангіопатії нижніх кінцівок (Wald=22,116; $p=4,1e-06$), нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації (Wald=7,054; $p=0,007$) і артеріальної гіпертензії (Wald=3,899; $p=0,042$). Якісні і класифікаційні характеристики моделей за вмістом у крові TNF α надано у таблиці 4.14. Моделі прогнозу мали задовільні показники якості (AUC від 0,643 до 0,762) і правильність (від 55,9 % для артеріальної гіпертензії до 71,7 % для макроангіопатії нижніх кінцівок).

Вміст ДК (див. табл. 4.10) зворотно впливав на наявність макроангіопатії нижніх кінцівок (Wald=17,974; $p=2,2e-05$), нефропатії за альбумінурією (Wald=4,355; $p=0,037$) і артеріальної гіпертензії (Wald=4,619; $p=0,032$). Класифікаційні і якісні характеристики моделей за вмістом у крові

ДК надано у таблиці 4.15 і демонструють задовільні значення показників.

Таблиця 4.14

Класифікаційні характеристики і значення точок відсічі для моделей прогнозування діабетичних ускладнень за вмістом у крові TNF α

Залежна змінна	β_0	β_1	AUC	Точка відсічі	Вірний позитивний прогноз, %	Вірний негативний прогноз, %	Правильність, %
P _(РП)	-0,044	0,012	0,675	0,765	59,66	51,52	57,9
P _(МАНК)	-1,209	0,011	0,694	0,175	75,00	70,83	71,7
P _(НП ШКФ)	-0,919	0,007	0,643	0,484	60,26	58,11	59,2
P _(АГ)	-5,328	0,033	0,762	0,449	56,34	55,56	55,9

Таблиця 4.15

Класифікаційні характеристики і значення точок відсічі для моделей прогнозування діабетичних ускладнень за вмістом у крові ДК

Залежна змінна	β_0	β_1	AUC	Точка відсічі	Вірний позитивний прогноз, %	Вірний негативний прогноз, %	Правильність, %
P _(НП АУ)	6,035	-0,843	0,644	0,161	75,00	63,33	65,8
P _(АГ)	2,697	-0,553	0,620	0,819	61,42	64,00	62,8
P _(МАНК)	5,582	-1,391	0,754	0,438	66,20	56,79	61,2

Таким чином, регресійний аналіз надав оцінку впливу кожного з чинників ЕДФ на розвиток діабетичних ускладнень, що підтверджувало патогенетичне значення чинників ЕДФ для розвитку відповідних ускладнень.

Надалі на основі отриманих значень точок відсічі були розраховані критичні концентрації для кожного чинника ЕДФ (4.8), що відповідали окремим діабетичним ускладненням. Їх значення приведено в табл. 4.16.

Відмічено, що вміст ендотеліну-1 вищий за 1,990 фмоль/мл підтверджував розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, а вище за

2,309 фмоль/мл – інших ускладнень. Збільшення вмісту у крові $\text{TNF}\alpha$ вище за 102,0 пг/мл і 105,1 пг/млР характеризувало розвиток ретинопатії та нефропатії, відповідно.

Таблиця 4.16

Критичні значення чинників ЕДФ для розвитку діабетичних ускладнень

Наявність ускладнення:	ET1, фмоль/мл	NOx, мкмоль/л	eNOS, пг/мл	$\text{TNF}\alpha$, пг/мл	ДК, Од/мл
ретинопатії	>2,404	-	-	>102,0	-
макроангіопатії нижніх кінцівок	>2,447	<6,298	<218,4	>114,5	<5,194
полінейропатії	>2,309	-	-	-	-
нефропатії за ШКФ	>2,253	-	-	>105,1	-
нефропатії за МАУ	>1,990	-	<250,4	-	<5,368
артеріальної гіпертензії	>2,311	<6,290	-	>102,0	<5,328

Розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, крім ендотеліну-1, підтверджувало зменшення вмісту у крові eNOS нижче за 250,4 пг/мл та ДК нижче за 5,368 Од/мл. Для всіх чинників встановлені критичні рівні розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок та майже для всіх (крім eNOS) – на розвиток артеріальної гіпертензії.

Резюме. Рівні чинників ЕДФ залежали від тяжкості ЦД2Т. Так, вміст у крові ET1 у хворих перевищував контроль у 3,7-4,7 рази ($p<0,001$) з максимальними значеннями у 2-й і 3-й групах; також зростав рівень у крові NOx (у 1,4-1,5 рази; $p<0,001$). Найбільшого приросту сягали рівні $\text{TNF}\alpha$ (у 4,2-6,5 рази; $p<0,001$) і ДК (у 2,3-2,7 рази; $p<0,001$). Вміст у крові eNOS у групах хворих був нижчим при порівнянні з контролем (у 1,3-1,9 рази; $p<0,001$). Однофакторний регресійний аналіз показав, що ET1 обумовлював високу глікемію, альбумінурію, підвищував ступінь декомпенсації ЦД2Т і

ступінь діабетичної нефропатії. Накопичення у крові NOx впливало на зниження швидкості клубочкової фільтрації та погіршення функції нирок. TNF α і ДК комплексно впливали на майже всі ключові показники ЦД2Т, що мало синергічну дію з іншими чинниками ЕДФ. Чинники ЕДФ, що було вивчено, мали вплив на розвиток ускладнень ЦД2Т: ET1 прямо впливав на розвиток всіх ускладнень ЦД2Т (крім макроангіопатії нижніх кінцівок); TNF α мав вплив на розвиток ретинопатії, нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації і артеріальної гіпертензії; накопичення у крові NOx сприяло розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок. Шляхом багатофакторної логістичної регресії побудовані адекватні моделі прогнозування розвитку ускладнень ЦД2Т на підставні вивчених чинників ЕДФ. Всі моделі мають високий рівень прогностичної точності (60,5% - 90,8%).

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступних публікацій [9, 12, 16, 17, 22].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ГЕНЕТИЧНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ НА РОЗВИТОК ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-го ТИПУ ТА ЙОГО УСКЛАДНЕНЬ

5.1. Зв'язок поліморфізму *rs1799983* (*G894T*, *Glu298Asp*) гена *NOS3* з цукровим діабетом 2 типу

В даному підрозділі був проведений аналіз результатів визначення асоціації поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* з ЦД2Т, розвитком ускладнень, клініко-лабораторними показниками, що характеризують тяжкість перебігу захворювання та чинниками ЕДФ. При проведенні аналізу було порівняно дані, отримані в контрольній групі (пацієнти відповідної статі та віку, які не мали ЦД2Т, 95 пацієнтів), з даними хворих (152 пацієнти).

Розподіл генотипів у контрольній групі, згідно до наших даних (рис. 5.1), було порівняно з результатами Програми 1000 Genomes Project Phase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>).

У Програмі для визначення частот генотипів *rs1799983* гена *NOS3* було залучено 2504 людини. Предковий генотип G/G був визначений з частотою 0,694 (у наших дослідженнях – 0,46), гетерозигота G/T – 0,260 (у наших дослідженнях – 0,41), мутантна гомозигота T/T – 0,046 (у наших дослідженнях – 0,13); у європейській популяції (n=503) показники склали, відповідно, 0,443; 0,425 та 0,131. Отже, наші результати збігалися з результатами для європейській популяції.

Порівняння розподілу алелей пацієнтів контрольної групи (рис. 5.1) з даними Програми 1000 Genomes Project Phase 3 показало наступне. Для всіх спостережень (n=5008) предковий алель G був визначен з частотою 0,824 (у наших дослідженнях – 0,67), мутантний алель T – 0,176 (у наших дослідженнях – 0,33); для європейській популяції (n=1006) показники склали, відповідно, 0,654 та 0,344. Таким чином, результати контрольної

групі як по розподілу генотипів, так і алелей відповідали даним Програми 1000 Genomes Project Phase 3 для європейської популяції.

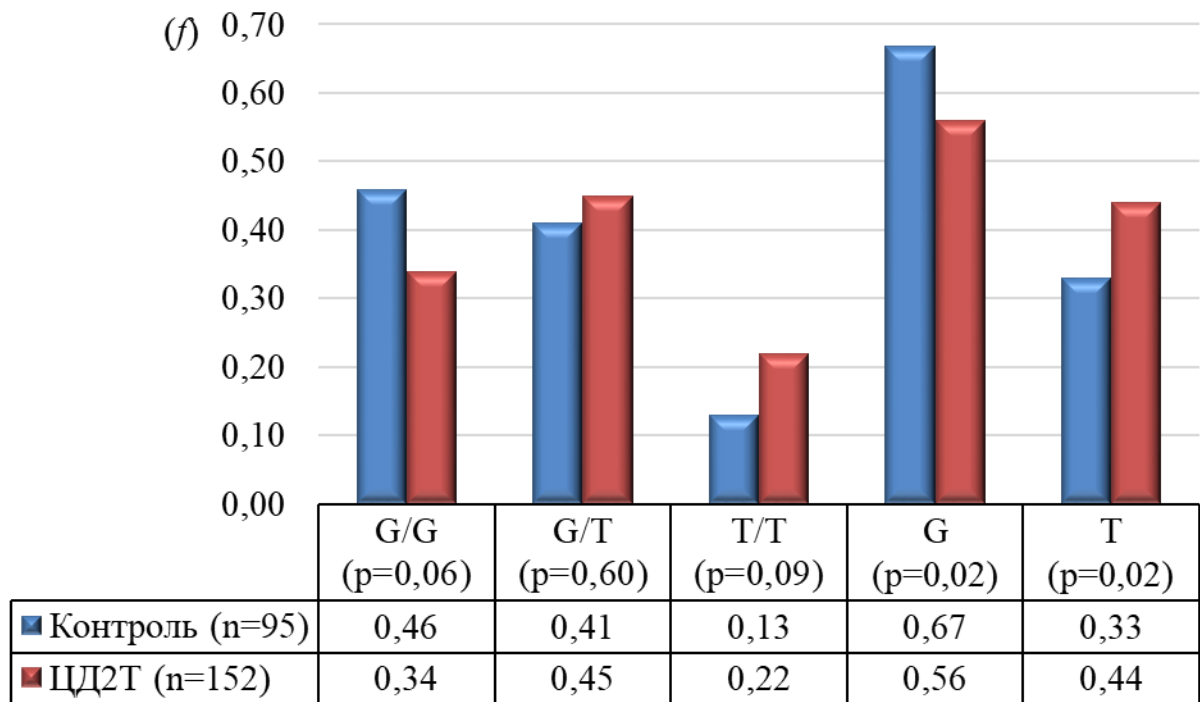


Рис. 5.1. Розподіл частот генотипів і алелей *rs1799983* гена *NOS3* між контрольною групою пацієнтів і групою хворих на ЦД2Т та статистична значущість розбіжностей частот між групами за критерієм *Fet2*.

У порівнянні з контролем (див. рис. 5.1), у хворих на ЦД2Т відмічено зменшення частоти предкового гомозиготного генотипу *G/G* ($p=0,06$) та збільшення частоти міnorного генотипу *T/T* ($p=0,09$).

Відповідно результатам розподілу генотипів, розподіл алелей показав, що у хворих на ЦД2Т відмічено зменшення частоти предкового алеля *G* (у 1,2 рази; $p=0,02$) та збільшення частоти міnorного алеля *T* (у 1,3 рази; $p=0,02$).

Таким чином, можна було стверджувати, що розподіл поліморфних алелей *rs1799983* гена *NOS3* відрізнявся за групами.

Результат перевірки впливу розподілу частот генотипів та алелей *rs1799983* гена *NOS3* на розвиток ЦД2Т і ступінь їх асоціації з захворюванням наведено в таблиці 5.1. Слід зазначити, що Тест Харді-

Вайнберга для контролів та випадків відповідав випадковому характеру успадкування (відповідно, $\chi^2=0,52$; $df=1$; $p=0,471$ та $\chi^2=1,30$; $df=1$; $p=0,254$).

Таблиця 5.1

Вплив розподілу частот генотипів і алелей *rs1799983* гена *NOS3* на розвиток ЦД2Т і ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи Алелі	ЦД2Т, n (f)	Контроль, n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
<i>G/G</i>	51 (0,34)	44 (0,46)	5,30	0,071	0,59	0,35–0,99
<i>G/T</i>	68 (0,45)	39 (0,41)			1,16	0,69–1,95
<i>T/T</i>	33 (0,22)	12 (0,13)			1,92	0,94–3,93
<i>G</i>	170 (0,34)	127 (0,67)	5,82	0,016	0,63	0,43–0,92
<i>T</i>	134 (0,45)	63 (0,33)			1,59	1,09–2,32

Аналіз результатів по впливу генотипів, що наведений у таблиці спряженості (3×3), показав, що поліморфізм *rs1799983* не мав зв'язку з захворюванням ($\chi^2=5,30$; $p=0,071$). Порівняння частот алелей, яке наведено у таблиці спряженості (2×2), показало, що $\chi^2=5,82$; $p=0,016$. Отже, алельний поліморфізм *rs1799983* мав зв'язок із розвитком ЦД2Т. Мінорний алель *T* збільшував у 1,6 рази шанси розвитку захворювання (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09–2,32), тоді як предковий алель *G* такі шанси зменшував у 1,6 рази (ВШ=0,63; 95% ВІ 0,43–0,92).

Оскільки мінорний алель *T* збільшував шанси розвитку ЦД2Т, то його наявність можна було розглядати як фактор ризику розвитку захворювання: шанси розвитку ЦД2Т у хворих з української популяції носіїв алеля *T* збільшені у 1,6 рази ($p=0,016$), тоді як за наявності предкового алеля *G* такі шанси було знижено, що вказувало на протекторну дію предкового алеля.

Численні повідомлення також вказували на важливу роль поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* на розвиток ЦД2Т. Так, у єгипетському дослідженні D. El-Lebedy (2018) при обстеженні 272 осіб

було встановлено, що наявність мутантного алеля *T* у 3,07 рази збільшувала ризик розвитку ЦД2Т та у 3,08 рази ризик серцево-судинних захворювань у таких хворих [92]. У широкомасштабному китайському дослідженні з популяції Хан (1234 хворих на ЦД2Т та 1272 контролів) показана значуща різниця у розподілі мутантного алеля поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* ($p=2,10 \times 10^{-3}$), отже був встановлений його зв'язок з ЦД2Т [154].

Для з'ясування ролі алелей у генотипі було проведено порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування. Результати розрахунку розподілу генотипів поліморфізму *rs1799983* та генетичного ризику захворювання представлені у таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Вплив розподілу частот генотипів *rs1799983* гена *NOS3* на розвиток ЦД2Т і ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи	ЦД2Т (n=152), n (f)	Контроль (n=95), n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
Домінантна модель успадкування						
<i>G/G</i>	51 (0,34)	44 (0,46)	4,02	0,045	0,59	0,35–0,99
<i>G/T+T/T</i>	101 (0,66)	51 (0,54)			1,71	1,01–2,89
Рецесивна модель успадкування						
<i>G/G+G/T</i>	119 (0,78)	83 (0,87)	3,23	0,072	0,52	0,25–1,07
<i>T/T</i>	33 (0,22)	12 (0,13)			1,92	0,94–3,93

Розподіл генотипів *rs1799983* за домінантною моделлю успадкування (*G/G* проти *G/T+T/T*) мав статистичну значущість ($\chi^2=4,02$; $p=0,045$), тоді як розподіл генотипів за рецесивною моделлю успадкування значущим не був ($\chi^2=3,23$; $p=0,072$). Такий результат підтвердив наявність асоціації з ЦД2Т саме за умов наявності у генотипі мінорного алеля *T* (*G/T+T/T*).

У цьому плані необхідно зазначити, що мета-аналіз 2015 року [131], до

якого було залучено 19 повідомлень (8600 випадків), також виявив зв'язок алеля *T* поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* з ЦД2Т у домінантній моделі (ВШ=1,14; 95% ВІ 1,03-1,26): алель *T* проти алеля *G* (ВШ=1,18; 95% ВІ 1,09-1,27) і генотипу *TT* проти генотипу *GG* (ВШ=1,33; 95% ВІ 1,09-1,62), що цілком узгоджувалося з нашими даними.

Таким чином, підсумовуючи результати даного фрагменту, можна визнати, що при ЦД2Т зменшувалася частота предкового алеля *G* та збільшувалася – мінорного алеля *T* ($p=0,016$). Доведено, що у хворих з української популяції розподіл алелей *rs1799983* був пов'язаний з розвитком захворювання ($\chi^2=5,82$; $p=0,016$). Наявність у генотипі мінорного алеля *T* збільшувало у 1,6 рази (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32) шанси розвитку ЦД2Т. Зв'язок з захворюванням за домінантною моделлю успадкування ($\chi^2=4,02$; $p=0,045$) показав, що патогенна дія генотипу проявлялася у носіїв алеля *T* (ВШ=1,92; 95% ВІ 0,94-3,93).

Оскільки за наявності ускладнень згідно до існуючого Протоколу [37] хворих було поділено на три групи, надалі було зроблено спробу з'ясування впливу розподілу генотипів та алелей поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* на груповий розподіл хворих (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

**Розподіл генотипів та алелей поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3*
у групах хворих та його вплив на груповий розподіл**

Генотипи	Групи хворих на ЦД2Т, n (f)			χ^2	p
	1-а, n=57	2-а, n=63	3-я, n=32		
<i>G/G</i>	17 (0,298)	23 (0,365)	11 (0,344)	2,66	0,614
<i>G/T</i>	24 (0,421)	30 (0,476)	14 (0,437)		
<i>T/T</i>	16 (0,281)	10 (0,159)	7 (0,219)		
Алелі	n=114	n=126	n=64	2,17	0,338
<i>G</i>	58 (0,509)	76 (0,603)	36 (0,563)		
<i>T</i>	56 (0,491)	50 (0,397)	28 (0,437)		

Як витікало з цієї таблиці, високі значення статистичних відмінностей ($p>0,05$) і для генотипів і для алелей показали, що для розподілення хворих

на групи розподіл і генотипів, і алелей поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* значення не мав. Отже це вказувало і на відсутність достеменною різниці між їх розподілом у групах хворих.

Отримавши такий результат, було вирішено визначити: чи мають генотипи і алелі поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* значення для ступеня компенсації вуглеводного обміну, оціненого за рівнем глікемії (табл. 5.4) та HbA1c (табл. 5.5).

Таблиця 5.4

Вплив генотипів і алелей *rs1799983* на розподіл хворих за ступенями компенсації вуглеводного обміну в залежності від рівня глікемії

Генотипи	Ступінь компенсації, n (f)					χ^2	p
	1-й, n=1	2-й, n=12	3-й, n=92	4-й, n=34	5-й, n=13		
<i>G/G</i>	0 (0,000)	5 (0,417)	28(0,304)	13(0,382)	5 (0,384)	7,86	0,447
<i>G/T</i>	1 (1,000)	7 (0,583)	40(0,435)	16(0,471)	4 (0,308)		
<i>T/T</i>	0 (0,000)	0 (0,000)	24(0,261)	5 (0,147)	4 (0,308)		
Алелі	n=2	n=24	n=184	n=68	n=26	4,23	0,376
<i>G</i>	1 (0,500)	17(0,708)	96(0,522)	42(0,618)	14(0,538)		
<i>T</i>	1 (0,500)	7 (0,292)	88(0,478)	26(0,382)	12(0,462)		

Таблиця 5.5

Вплив генотипів і алелей на розподіл хворих на ЦД2Т за ступенями компенсації вуглеводного обміну в залежності від рівню HbA1c

Генотипи	Ступінь компенсації, n (f)			χ^2	p
	1-й, n=24	2-й, n=33	3-й, n=95		
<i>G/G</i>	8 (0,333)	9 (0,273)	34 (0,358)	12,25	0,015
<i>G/T</i>	14 (0,584)	10 (0,303)	44 (0,463)		
<i>T/T</i>	2 (0,083)	14 (0,424)	17 (0,179)		
Алелі	n=48	n=66	n=190	6,43	0,040
<i>G</i>	30 (0,625)	28 (0,424)	112 (0,589)		
<i>T</i>	18 (0,375)	38 (0,576)	78 (0,411)		

Розподіл генотипів та алелей в залежності від рівня гіперглікемії у хворих на ЦД2Т не відрізнявся (відповідно, $p=0,447$ і $p=0,376$). На відміну від

цього, статистичну значущість мала його залежність від рівня HbA1c (відповідно, $p=0,015$ і $p=0,040$).

Звертав на себе увагу зріст частоти хворих з поганою компенсацією ЦД2Т (2-й та 3-й ступені компенсації) за умов наявності у них генотипу *T/T* та алеля *T*. Отже, можна було зробити висновок, що наявність алеля *T* сприяла декомпенсації ЦД2Т за рівнем у крові HbA1c.

Наступною задачею дослідження було з'ясування впливу генотипу поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* на наявність діабетичних ускладнень. Як витікало з проведеного аналізу вірогідний вплив генотипи мали тільки на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\chi^2=10,15$; $p=0,006$). На відміну від цього, алелі мали більш широкий діапазон впливів: на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\chi^2=8,00$; $p=0,005$) і за рівнем альбумінурії ($\chi^2=4,81$; $p=0,028$) та на наявність артеріальної гіпертензії ($\chi^2=4,74$; $p=0,029$).

У дослідженнях [119,223] було доведено зв'язок поліморфізма *rs1799983* гена *NOS3* з розвитком діабетичної нефропатії. При цьому, поліморфізм *rs1799983* не впливав на активність NO у судинах нирки при діабетичній нефропатії, але алель *T* був пов'язаний з підвищенням окисного стресу у таких випадках [229]. На значущий зв'язок поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* з розвитком діабетичної нефропатії вказувало також дослідження, що було проведено у Північному Китаї (431 хворий на ЦД2Т з діабетичною нефропатією проти 420 хворих на ЦД2Т без неї) [119].

Отже, можна було заключити, що поліморфізм *rs1799983* гена *NOS3* мав зв'язок з розвитком діабетичної нефропатії, що могло бути пов'язане з інтенсифікацією окисного стресу та, як на наш погляд, – і зі зниженням функції нирок, а також – рівню NO, що продукується eNOS.

Для підтвердження такого припущення був проаналізований вплив генотипів поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* на клініко-лабораторні показники, що асоціюються з функцією нирок. Перевірка за критерієм Kruskal-Wallis наявності впливу генотипів на клініко-лабораторні

показники, що асоціюються з функцією нирок, показала наявність такого впливу на рівень у крові креатиніну ($H=8,74$; $p=0,013$), швидкість клубочкової фільтрації ($H=8,28$; $p=0,016$) і рівень альбумінурії ($H=8,32$; $p=0,016$).

Тих самих результатів виявлено і для алелей: вплив визначено для рівню у крові креатиніну ($U=9546$; $p=0,015$), швидкості клубочкової фільтрації ($U=9252$; $p=0,005$) і рівню альбумінурії ($U=9533$; $p=0,015$). При цьому рівень креатиніну і альбумінурії були вищими за наявності генотипу T/T і алеля T проти генотипу G/G , а рівень швидкості клубочкової фільтрації – суттєво нижче.

Надалі було проаналізовано вплив генотипів на показники стану хворих на ЦД2Т. Перевірка за критерієм Kruskal-Wallis наявності впливу генотипів на кількісні показники стану хворих на ЦД2Т показала відсутність такого впливу на вік хворих ($H=3,32$; $p=0,190$), тривалість хвороби ($H=1,68$; $p=0,431$), ІМТ ($H=2,17$; $p=0,337$), АТс ($H=2,93$; $p=0,231$) і АТд ($H=1,70$; $p=0,427$).

Виключення склав ІТХ ($H=8,34$; $p=0,015$), що вказувало на наявність впливу генотипу на запропонований інтегративний показник тяжкості перебігу ЦД2Т. При цьому ІТХ був вищим при наявності генотипу T/T ($Me=7,41$; $Q1;Q3=5,45;10,64$) проти генотипу G/G ($Me=6,00$; $Q1;Q3=3,03;7,69$).

Перевірка за критерієм Mann-Whitney наявності впливу алелей на ті самі показники також показала відсутність впливу на вік хворих ($U=9955$; $p=0,059$), тривалість хвороби ($U=10434$; $p=0,209$), ІМТ ($U=10341$; $p=0,168$), АТс ($U=10050$; $p=0,078$) і АТд ($U=10434$; $p=0,209$). Як і у випадку с генотипами, виключення склав ІТХ ($U=9594$; $p=0,018$), що вказувало на наявність впливу алелей на інтегративний показник тяжкості ЦД2Т. При цьому ІТХ був вищим за наявністю алеля T ($Me=6,54$; $Q1;Q3=3,77;9,09$) проти алеля G ($Me=5,77$; $Q1;Q3=3,39;7,69$).

На останнє було проаналізовано вплив поліморфізму *rs1799983* гена

NOS3 на чинники ЕДФ (табл. 5.6 та 5.7).

Таблиця 5.6

**Вплив генотипів *rs1799983* гена *NOS3* на вміст чинників,
асоційованих з ЕДФ, Ме (Q1; Q3)**

Показники	Генотип			Н	р
	<i>G/G</i> , n=51	<i>G/T</i> , n=68	<i>T/T</i> , n=33		
ЕТ1, фмоль/мл	2,13 (1,94; 2,63)	2,29 (1,93; 2,57)	2,40 (2,13; 2,56)	2,28	0,319
NOх, мкмоль/л	6,47 (5,97; 7,04)	6,36 (6,36; 5,78)	6,04 (5,65; 6,31)	13,79	0,001
eNOS, пг/мл	269,78 (250,31; 364,79)	210,19 (191,85; 253,71)	159,22 (151,91; 220,13)	71,77	<0,001
TNFα, пг/мл	103,23 (91,74; 124,34)	107,63 (81,43; 125,88)	93,36 (72,87; 114,74)	3,46	0,178
ДК, Е/мл	5,41 (4,74; 5,65)	5,30 (4,39; 5,56)	5,19 (4,55; 5,65)	1,45	0,485

Таблиця 5.7

**Вплив алелей *rs1799983* гена *NOS3* на вміст чинників,
асоційованих з ЕДФ, Ме (Q1; Q3)**

Показники	Алелі		U	р
	<i>G</i> , n=170	<i>T</i> , n=134		
ЕТ1, фмоль/мл	2,22 (1,94; 2,57)	2,33 (1,99; 2,57)	10198	0,117
NOх, мкмоль/л	6,43 (5,34; 8,07)	6,19 (5,73; 6,57)	8630	2,9e-04
eNOS, пг/мл	254,54 (222,13; 298,06)	206,23 (159,22; 230,85)	4732	2,2e-18
TNFα, пг/мл	104,15 (90,55; 124,34)	97,07 (75,29; 122,30)	10064	0,081
ДК, Е/мл	5,32 (4,65; 5,61)	5,27 (4,45; 5,59)	10452	0,218

Як і можна було очікувати, серед всіх чинників ЕДФ, вплив поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* виявився у відношенні вмісту у NOх (відповідно, для генотипів Н=13,79; р=0,001 і для алелей U=8630; р=2,9e-04) та, більшою мірою, для eNOS (відповідно, для генотипів Н=71,77; р=<0,001 і

для алелей $U=4731$; $p=2,2e-18$). З рештою чинників (ET1, $TNF\alpha$ та ДК) такого впливу виявлено не було.

При цьому, рівень у крові NOx був вищим за наявності проєктивного генотипу G/G проти генотипу ризику T/T (відповідно, $Me=6,47$; $Q1;Q3=5,97;7,04$ проти $Me=6,04$; $Q1;Q3=5,65;6,31$) та алеля G проти алеля T (відповідно, $Me=6,43$; $Q1;Q3=5,34;8,07$ проти $Me=6,19$; $Q1;Q3=5,73;6,57$).

Рівень у крові eNOS також був вищим за наявності проєктивного генотипу G/G проти генотипу ризику T/T (відповідно, $Me=269,78$; $Q1;Q3=250,31;364,79$ проти $Me=159,22$; $Q1;Q3=151,91;220,13$) та алеля G проти алеля T (відповідно, $Me=254,54$; $Q1;Q3=221,13;298,06$ проти $Me=206,23$; $Q1;Q3=159,22;230,85$).

Відповідно, генотип ризику T/T та мінорний алель T сприяли меншим величинам цих захисних факторів. З останнього можна зробити висновок, що патогенетична роль поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* полягала саме у зменшенні активності eNOS та рівню у крові NOx. Іншими словами, генотип ризику T/T та мінорний алель T сприяли зменшенню рівнів у крові і NOx, і eNOS, що у наших дослідженнях відповідало накопиченню у крові креатиніну, альбумінурії і зменшенню швидкості клубочкової фільтрації, що в свою чергу, обґрунтовувало зв'язок поліморфізму саме з розвитком діабетичної нефропатії.

5.2. Зв'язок поліморфізму *rs1800629* гена *TNF\alpha* з цукровим діабетом 2-го типу

У цьому підрозділі було визначено зв'язок поліморфізму *rs1800629* гена *TNF\alpha* з ЦД2Т у українських хворих, а також – зв'язок з розвитком ускладнень і чинниками ЕДФ.

На першому етапі результати розподілу генотипів і алелей у контрольній групі, що було отримано у нашому дослідженні було порівняно з результатами Програми 1000 Genomes Project Phase 3

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?v=rs1800629;vd=b=variation).

У Програмі для визначення частот генотипів *rs1800629* гена *TNF α* було залучено 2504 людини. Предковий генотип *G/G* був визначений з частотою 0,827 (у наших дослідженнях – 0,663), гетерозигота *G/A* – 0,165 (у наших дослідженнях – 0,284), мінорна гомозигота *T/T* – 0,008 (у наших дослідженнях – 0,053); для європейської популяції ($n=503$) частоти склали, відповідно, 0,744; 0,245 та 0,012. Отже, наші результати більшою мірою збігалися з результатами для європейської популяції.

При порівнянні розподілу алелей у контрольній групі (див. рис. 5.2) з даними Програми 1000 Genomes Project Phase 3 встановлено, що для всіх спостережень ($n=5008$) предковий алель *G* був визначений з частотою 0,910 (у наших дослідженнях – 0,805), мутантний алель *T* – 0,090 (у наших дослідженнях – 0,195); для європейської популяції ($n=1006$) показники склали, відповідно, 0,866 та 0,134.

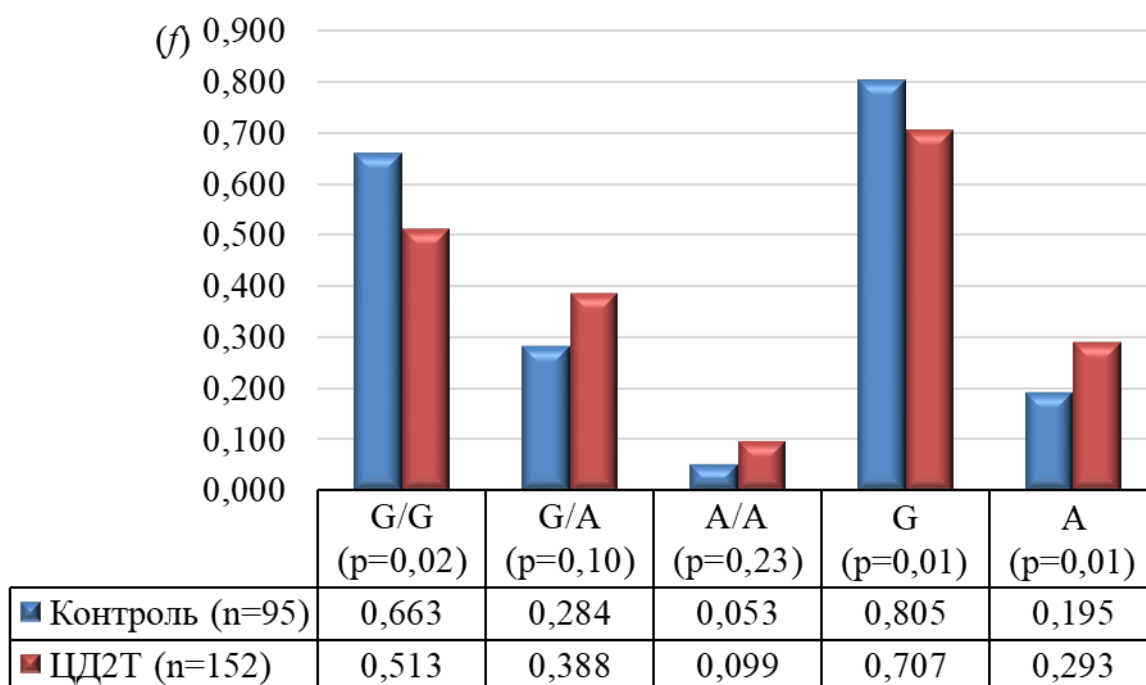


Рис. 5.2. Розподіл частот генотипів і алелей (f) *rs1800629* гена *TNF α* між контрольною групою і групою хворих на ЦД2Т та статистична значущість розбіжностей частот між групами за критерієм *Fet2*.

Отже, результати контрольної групи і по розподілу генотипів, і алелей більшою мірою відповідали даним Програми 1000 Genomes Project Phase 3 для європейської популяції. Визначення статистичної значущості відмінностей в розподілі частот у європейській популяції і нашому дослідженні показало такі результати: для генотипів $\chi^2=5,38$; $p=0,07$ та для алелей $\chi^2=3,28$; $p=0,07$). Отже, дійсно, суттєвих розбіжностей результатів досліджень визначено не було.

Надалі було проведено статистичне порівняння по розподілу генотипів і алелей у хворих з такими показниками в контрольній групі. Для цього спочатку було проаналізовано загальну тенденцію частот генотипів і алелей, потім – частотні різниці, які вказували на вплив генотипів та алелей на розвиток захворювання і, на остаток, – для відмінностей, значущих за критерієм χ^2 , розглянуто відношення шансів та 95% вірогідний інтервал, тобто – асоціацію з ЦД2Т (генетичний ризик).

Як свідчили дані, що наведено у графічній та табличній формах на рисунку 5.2, у групі хворих було відмічено значуще зменшення частоти предкового гомозиготного генотипу G/G (у 1,3 рази; $p=0,02$) у порівнянні з контролем. Збільшення частот гетерозиготного генотипу G/A та мінорного генотипу A/A (відповідно, у 1,4 та 2,0 рази) у порівнянні з контролем було статистично не значущим (відповідно, $p=0,10$ та $0,24$). Також у хворих відмічено статистично значуще зменшення частоти предкового алеля G (у 1,13 рази; $p=0,01$) та збільшення частоти мінорного алеля A (у 1,45 рази; $p=0,01$) у порівнянні з контролем.

Таким чином, було показано, що розподіл генотипу G/G і обох алелей *rs1800629* достеменно відрізнявся у хворих на ЦД2Т від контрольній групі. Виходячи з цього, було розраховано вплив розподілу частот генотипів і алелей (табл. 5.8) на розвиток ЦД2Т і ступінь їх асоціації з захворюванням. Тест Харді-Вайнберга для контролів та випадків відповідав випадковому характеру успадкування генотипів (відповідно, $\chi^2=0,84$; $df=1$; $p=0,360$ та $\chi^2=0,60$; $df=1$; $p=0,438$).

Аналіз впливу генотипів по таблиці спряженості (3×3) показав відсутність зв'язку з ЦД2Т ($\chi^2=5,65$; $p=0,059$). На відміну від цього, порівняння частот алелей за таблицею спряженості (2×2), показало наявність такого впливу ($\chi^2=5,91$; $p=0,015$).

Таблиця 5.8

Вплив розподілу частот генотипів і алелей *rs1800629* на розвиток ЦД2Т і ступінь їх асоціації з захворюванням (загальна модель успадкування)

Генотипи Алелі	ЦД2Т, n (f)	Контроль, n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
<i>G/G</i>	78 (0,513)	63 (0,663)	5,65	0,059	0,54	0,31–0,91
<i>G/A</i>	59 (0,388)	27 (0,284)			1,60	0,92–2,78
<i>A/A</i>	15 (0,099)	5 (0,053)			1,97	0,69–5,61
<i>G</i>	215 (0,707)	153 (0,805)	5,91	0,015	0,58	0,38–0,90
<i>A</i>	89 (0,293)	37 (0,195)			1,71	1,11–2,65

Отже, алельний поліморфізм *rs1800629* гена *TNFA* мав зв'язок із розвитком ЦД2Т, при цьому мінорний алель *A* збільшував у 1,7 рази шанси розвитку ЦД2Т (ВШ=1,71; 95% ВІ 1,11-2,65), тоді як предковий алель *G* такі шанси зменшував у 1,7 рази (ВШ=0,58; 95% ВІ 0,38-0,90).

Таким чином було показано, що мінорний алель *A* *rs1800629* збільшував шанси розвитку ЦД2Т і був фактором ризику розвитку цього захворювання: шанси розвитку ЦД2Т у хворих з української популяції-носіїв алеля *A* *rs1800629* були збільшені у 1,7 рази ($p=0,015$), тоді як предковий алель *G* можна було вважати протекторним фактором.

Порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування (табл. 5.9) показало, що розподіл генотипів за домінантною моделлю (*G/G* проти *G/A+A/A*) мав статистичну значущість: $\chi^2=5,37$; $p=0,020$, що підтвердило наявність асоціації *rs1800629* з ЦД2Т саме за умов наявності у генотипі мінорного алеля *A* (генотипи *G/A+A/A*).

Необхідно зазначити, що мета-аналіз Y. Zhao та співавт. (2014) [252], в

який було включено 38 незалежних досліджень, підтвердив зв'язок поліморфізму *rs1800629* гена *TNFA* з підвищеним ризиком розвитку ЦД2Т (ВШ=1,21; 95% ВІ 1,06-1,37; $p=0,003$) саме за домінантною моделлю успадкування, особливо, для азіатських носіїв мутації (*GA+AA*), які, як було розраховано, мали 39% підвищення ризику ЦД2Т (ВШ=1,39; 95% ВІ 1,11-1,74; $p=0,004$) у порівнянні з носіями дикого генотипу (*G/G*).

Таблиця 5.9

**Домінантна та рецесивна моделі успадкування впливу
rs1800629 на розвиток ЦД2Т**

Генотипи	ЦД2Т (n=152), n (f)	Контроль (n=95), n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
Домінантна модель успадкування						
<i>G/G</i>	78 (0,513)	63 (0,663)	5,37	0,020	0,54	0,31–0,91
<i>G/A+A/A</i>	74 (0,487)	32 (0,337)			1,87	1,10–3,18
Рецесивна модель успадкування						
<i>G/G+G/A</i>	137 (0,901)	90 (0,947)	1,67	0,200	0,51	0,18–1,44
<i>A/A</i>	15 (0,098)	5 (0,053)			1,97	0,69–5,61

У нашому дослідженні показано, що у хворих на ЦД2Т з української популяції носіїв мутаційних генотипів (*GA+AA*) ризик ЦД2Т також був суттєво підвищеним (на 87%), що, в цілому, узгоджувалося з даними цього мета-аналізу.

Надалі, згідно до плану дослідження, була перевірена наявність впливу генотипу *rs1800629* на ступінь тяжкості стану хворих і ступені компенсації діабету за показниками глікемії та глікованого гемоглобіну (HbA1c), що на наш погляд, могло би висвітлити наявність впливу генотипу на тяжкість захворювання. Нажаль, аналіз даних показав, що розподіл і генотипів, і алелей *rs1800629* статистичного значення у жодному випадку не мав ($p>0,05$). Також була показана відсутність впливу генотипів і алелей *rs1800629* на вік хворих, тривалість хвороби, ІМТ, величини АТ_С і АТ_Д ($p>0,05$).

Логічним у цьому плані здавався подальший пошук впливу *rs1800629* на розвиток окремих судинних ускладнень ЦД2Т. Як показали розрахунки, статистично значущий вплив генотипи мали на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\chi^2=6,38$; $p=0,041$). На цей самий показник впливав і розподіл алелей ($\chi^2=6,78$; $p=0,009$); на інші ускладнення розподіл генотипів (як і алелей) впливу не мав.

Виявленню зв'язку поліморфізмів генів прозапальних цитокінів (*TNF α* , *IL-6* і *IL-1 β*) з ЦД2Т і діабетичною нефропатією присвячено нещодавнє комплексне індійське дослідження [113]. Поліморфізм *rs1800629* гена *TNF α* було визначено у 1326 пацієнтів, серед яких було 448 особи з ЦД2Т та діабетичною нефропатією, 414 осіб з ЦД2Т без діабетичної нефропатії та 464 контролів. Найвищу асоціацію з ЦД2Т за наявності діабетичної нефропатії мав поліморфізм *rs1800629* гена *TNF α* : для генотипу *A/A* ВШ=2,75 (95% ВІ 1,64-4,59; $p=0,001$).

Дослідження зв'язку поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* з розвитком діабетичної нефропатії за рівнем альбумінурії було проведено у 756 хворих на ЦД2Т у роботі [231]. Встановлено, що алель *A* значно підвищував ризик альбумінурії (ВШ=2,1; 95% ВІ 0,8-3,7; $p<0,001$). Отже, ці дані цілком збігалися з результатами, отриманими у нашому дослідженні: в українській когорті хворих на ЦД2Т мінорний алель *A* та генотипи (*G/A+A/A*) були пов'язані з ЦД2Т та розвитком нефропатії у таких хворих.

Надалі було проаналізовано вплив алелей *rs1800629* на клініко-лабораторні показники, що відображали функцією нирок у хворих на ЦД2Т. Перевірка за критерієм Mann-Whitney показала наявність впливу алелей на швидкість клубочкової фільтрації ($U=8211$; $p=0,045$). При цьому її рівень був нижчим за наявності алеля ризику *A* проти предкового протективного алеля *G*. Це безпосередньо вказувало на патогенетичну роль мінорного алеля *A* у порушенні функції нирок при ЦД2Т. Розрахунки для генотипів показали відсутність їх впливу на всі досліджені показники функції нирок ($p>0,05$) і, у тому числі, – на швидкість клубочкової фільтрації ($p=0,165$).

Вплив поліморфізму *rs1800629* на чинники ЕДФ подано у таблиці 5.10. Вплив генотипів поліморфізму *rs1800629* серед всіх чинників ЕДФ виявився для вмісту у крові ET1 ($H=7,26$; $p=0,026$), NOx ($H=59,03$; $p<0,001$) і TNF α ($H=67,42$; $p<0,001$).

Таблиця 5.10

Вплив генотипу *rs1800629* на вміст чинників ЕДФ, Ме (Q1; Q3)

Показники	Генотипи			H	p
	G/G (n=78)	G/A (n=59)	A/A (n=15)		
ET1, фмоль/мл	2,14 (1,94; 2,51)	2,38 (2,01; 2,64)	2,45 (2,29; 2,67)	7,26	0,026
NOx, мкмоль/л	5,91 (5,68; 6,29)	6,58 (6,30; 7,07)	6,95 (6,68; 7,43)	59,03	<0,001
eNOS, пг/мл	234,40 (187,50; 264,66)	231,61 (197,61; 273,17)	230,52 (213,34; 285,37)	0,93	0,629
TNF α , пг/мл	82,90 (70,09; 96,75)	116,60 (105,37; 123,20)	147,27 (138,96; 196,76)	67,42	<0,001
ДК, Е/мл	5,30 (4,31; 5,67)	5,31 (5,10; 5,57)	5,22 (4,44; 5,55)	1,06	0,588

При цьому, рівні у крові всіх чинників були суттєво вищим за наявності генотипу ризику *A/A* проти предкового генотипу *G/G*, що особливо проявлялося для TNF α , рівень якого у носіїв генотипу *A/A* був вищим у 1,8 рази за носіїв генотипу *G/G* ($p<0,001$).

Аналогічні результати демонстрував і вплив алелей для ET1: $U=7735$; $p=0,008$; для NO: $U=4157$; $p=8,64E-15$ і для TNF α : $U=3665$; $p=2,60E-17$).

У дослідженні [113] показано, що у хворих на ЦД2Т-носіїв мінорного генотипу *A/A rs1800629* експресія гену *TNF α* була збільшена більш ніж у 4 рази ($n\text{-fold}=4,43\pm1,11$), що супроводжувалося суттєвим збільшенням рівнів у крові TNF α . Також у дослідженні [231] встановлено, що мінорний генотип *A/A* і алель *A rs1800629* значно підвищували рівні у крові TNF α , що було виражено більшою мірою у хворих з нефропатією. Отже, ці літературні дані, поряд із отриманими у даному дослідженні, встановлювали загальну патогенетичну закономірність: наявність мінорного алеля *A* є патогенетичним фактором розвитку діабетичної нефропатії, а одним з

механізмів розвитку цього стану може бути надлишкова експресія гену *TNF α* , що призведе до надмірного синтезу прозапального цитокіну *TNF α* . Більший вміст у таких хворих ET1 і стабільних метаболітів NO вказував на залучення і цих чинників ЕДФ у патогенез діабетичної нефропатії, можливо, внаслідок більшого пошкодження ендотелію у хворих-носіїв алеля *A*.

За сучасними уявленнями патогенез діабетичної нефропатії це складний багатовимірний процес в якому поєднується запалення, окисний стрес та генетичні чинники [142,248]. Ключова роль належить гломерулярній гіперфільтрації внаслідок порушення тубуло-гломерулярного зворотного зв'язку, що зменшує тонус аферентної артеріоли і призведе до гломерулярної гіпертензії. Вочевидь, що результати даного дослідження обґрунтовують залучення до цих механізмів і виявлені патогенетичні закономірності.

Відповідно отриманим результатам, можна було заключити, що поліморфізм *rs1800629* гена *TNF α* мав зв'язок з розвитком ЦД2Т, а серед ускладнень – з розвитком нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації. Мінорний алель *A* сприв зниженню швидкості клубочкової фільтрації, що пояснювало встановлений факт і реалізувалося через такі чинники ЕДФ, як значне підвищення рівню у крові *TNF α* , а також ET1 і NOx.

5.3. Зв'язок поліморфізмів рецептору ендотеліну (*rs6842241* гена *EDNRA* та *rs5351* гена *EDNRB*) з цукровим діабетом 2-го типу

У даному підрозділі була поставлена задача визначити патогенетичну роль ET1 та зв'язок поліморфізмів *rs6842241* гена *EDNRA* та *rs5351* гена *EDNRB* з ЦД2Т та його ускладненнями у когорті українських хворих (рис. 5.3 та 5.4).

Розподіл генотипів *rs6842241* гена *EDNRA* у контрольній групі (рис. 5.3) було порівняно з даними, оприлюдненими у Програмі 1000 Genomes Project Phase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>). Для визначення частот

генотипів *rs6842241* гена *EDNRA* було залучено 2504 людини. Предковий генотип *C/C* був визначений з частотою 0,554 (у наших дослідженнях – 0,72), гетерозигота *C/A* – 0,359 (у наших дослідженнях – 0,21), мутантна гомозигота *A/A* – 0,087 (у наших дослідженнях – 0,07); у європейській популяції ($n=503$) показники склали, відповідно, 0,763; 0,237 та 0,028.

Порівняння розподілу алелей *rs6842241* гена *EDNRA* у контрольній групі (див. рис. 5.3) з даними Програми 1000 Genomes Project Phase 3 показало, що для всіх спостережень ($n=5008$) предковий алель *C* був визначений з частотою 0,734 (у наших дослідженнях – 0,82), мутантний алель *A* – 0,266 (у наших дослідженнях – 0,18); для європейської популяції ($n=1006$) показники склали, відповідно, 0,854 та 0,146.

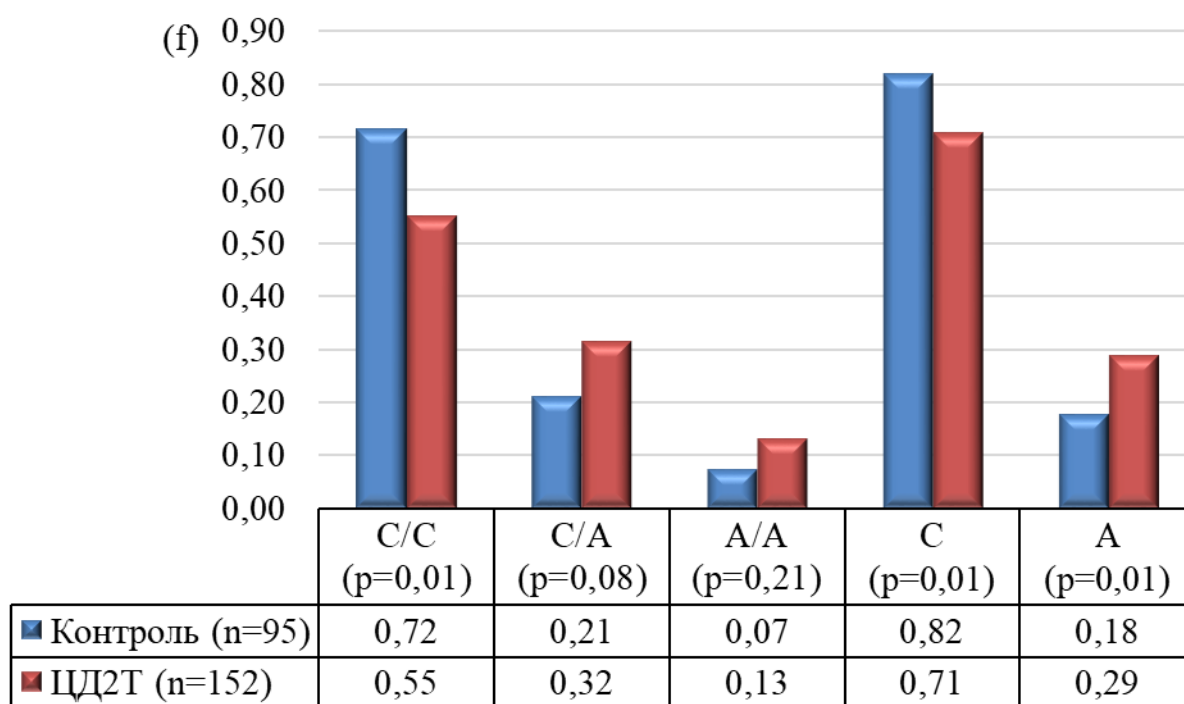


Рис. 5.3. Розподіл частот генотипів і алелей *rs6842241* гена *EDNRA* між контрольною групою пацієнтів і групою хворих на ЦД2Т та статистична значущість розбіжностей частот між групами за критерієм F_{et2} .

Таким чином, наші результати розподілу генотипів і алелей поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* збігалися з результатами Програми

1000 Genomes Project Phase 3, особливо – для європейської популяції.

У хворих на ЦД2Т в порівнянні з контролем (див. рис. 5.3) були відмічені такі статистично значущі зміни: зменшення частоти предкового гомозиготного генотипу *C/C* ($p=0,01$) та алеля *C* ($p=0,01$) та збільшення частоти міnorного алеля *A* ($p=0,01$). Отже, розподіл генотипу *C/C* і алелів *rs6842241* гена *EDNRA* мав зв'язок з розвитком ЦД2Т, що і було підтверджено при визначенні впливу частот генотипів і алелів на наявність захворювання (табл. 5.11).

Таблиця 5.11

**Розподіл частот генотипів і алелів *rs6842241* гена *EDNRA*
і ступінь їх асоціації з ЦД2Т**

Генотипи Алелі	ЦД2Т, n (f)	Контроль, n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
<i>C/C</i>	84 (0,553)	68 (0,716)	6,67	0,035	0,49	0,28-0,85
<i>C/A</i>	48 (0,316)	20 (0,210)			1,73	0,95-3,15
<i>A/A</i>	20 (0,131)	7 (0,074)			1,90	0,77-4,69
<i>C</i>	216 (0,711)	156 (0,821)	7,68	0,005	0,53	0,34-0,84
<i>A</i>	88 (0,289)	34 (0,179)			1,87	1,20-2,92

Аналіз впливу генотипів по таблиці спряженості (3×3) показав наявність зв'язку *rs6842241* гена *EDNRA* з ЦД2Т ($\chi^2=6,67$; $p=0,035$). Генотипами ризику виявилися гетерозиготний генотип *C/A*, який у 1,7 рази підвищував ризик (ВШ=1,73; 95% ВІ 0,95-3,15) та міnorний генотип *A/A*, який у 1,9 рази підвищував ризик (ВШ=1,90; 95% ВІ 0,77-4,69). Предковий генотип *C/C* такі шанси знижував (ВШ=0,49; 95% ВІ 0,28-0,85), що вказувало на його протекторний ефект.

Порівняння частот алелів за таблицею спряженості (2×2) також показало наявність впливу й алельного поліморфізму ($\chi^2=7,68$; $p=0,005$) на розвиток ЦД2Т у порівнянні з контролем. Міnorний алель *A* підвищував ризик його розвитку у 1,9 рази (ВШ=1,87; 95% ВІ 1,20-2,92), а предковий

алель *C* – знижував (ВШ=0,53; 95% ВІ 0,34-0,84). Отже генетичним фактором ризику розвитку ЦД2Т була наявність у генотипі алеля *A* поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* (тобто гетеро- та гомозиготного мінорного генотипів).

Для остаточного з'ясування ролі алелей у генотипі було проведено порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування. Результати розрахунку розподілу генотипів поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* та генетичного ризику захворювання представлені у таблиці 5.12.

Таблиця 5.12

Вплив розподілу частот генотипів *rs6842241* гена *EDNRA* на розвиток ЦД2Т і ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи	ЦД2Т (n=152), n (f)	Контроль (n=95), n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
Домінантна модель успадкування						
C/C	84 (0,55)	68 (0,72)	6,58	0,010	0,49	0,28 – 0,85
C/A+A/A	68 (0,45)	27 (0,28)			2,04	1,18 – 3,53
Рецесивна модель успадкування						
C/C+C/A	132 (0,87)	88 (0,93)	2,01	0,156	0,53	0,21 – 1,29
A/A	20 (0,13)	7 (0,07)			1,90	0,77 – 4,69

Розподіл генотипів *rs6842241* гена *EDNRA* за домінантною моделлю успадкування (*C/C* проти *C/A+A/A*) мав статистичну значущість за критерієм χ^2 Пірсона ($\chi^2=6,58$; $p=0,01$), тоді як розподіл генотипів за рецесивною моделлю успадкування значущим не був ($\chi^2=2,01$; $p=0,156$). Отже, це підтвердило наявність асоціації з ЦД2Т *rs6842241* гена *EDNRA* саме за умов наявності у генотипі мінорного алеля *A* (генотипи *C/A* і *A/A*) та збільшення ризику розвитку ЦД2Т у носіїв таких генотипів у два рази (ВШ=2,04; 95% ВІ 1,18-3,58).

Таким чином, було показано, що при ЦД2Т у хворих з української популяції зменшувалася частота предкового генотипу *C/C* і алеля *C* та збільшувалася частота мінорного алеля *A* ($p=0,01$); поліморфізм *rs6842241*

гена *EDNRA* був пов'язаний з розвитком захворювання, а генотипи з мінорним алелем *A* (*C/A* і *A/A*) удвічі збільшували ризик ЦД2Т у порівнянні з носіями генотипу *C/C* ($p=0,01$).

Надалі було розраховано вплив розподілу генотипів та алелей поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* на розподіл хворих на групи, що, згідно до умов нашого дослідження, давало уявлення про зв'язок поліморфізму з прогресуванням захворювання. А ні для генотипів, а ні для алелей такого впливу встановлено не було (відповідно, $p=0,396$ і $0,255$).

Поліморфізм *rs6842241* гена *EDNRA* не мав значення для ступеня компенсації вуглеводного обміну, оціненого за рівнем глікемії і HbA1c у носіїв різних генотипів (відповідно, $p=0,080$ і $p=0,201$). Розподіл алелей також не мав значення для ступеня компенсації вуглеводного обміну, оціненого за рівнем HbA1c ($p=0,179$), але для ступеня компенсації вуглеводного обміну, оціненого за рівнем глікемії такий вплив був виявлений ($p=0,020$; табл. 5.13). Частота хворих-носіїв предкового алеля *C* була нижчою при поганій компенсації діабету (3-5-й ступені у порівнянні з 2-м ступенем), тоді як для частоти хворих-носіїв мінорного алеля *A* ситуація була зворотною.

Таблиця 5.13

Вплив алелей *rs6842241* гена *EDNRA* на розподіл хворих за ступенями компенсації вуглеводного обміну в залежності від рівня глікемії

Алелі	Ступінь компенсації, n (f)					χ^2	p
	1 (n=2)	2 (n=24)	3 (n=184)	4 (n=68)	5 (n=26)		
<i>C</i>	0 (0,000)	22 (0,917)	124 (0,674)	50 (0,735)	20 (0,769)	11,70	0,020
<i>A</i>	2 (1,000)	2 (0,083)	60 (0,326)	18 (0,265)	6 (0,231)		

Отже, наявність алеля *A* сприяла гіршій компенсації ЦД2Т за ступенем компенсації вуглеводного обміну, оціненого за рівнем глікемії.

Надалі був з'ясований вплив генотипу поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* на наявність діабетичних ускладнень. На діабетичну ретинопатію, діабетичну сенсорну полінейропатію; діабетичну нефропатію за швидкістю клубочкової фільтрації та за рівнем альбумінурії та діабетичну макроангіопатію нижніх кінцівок поліморфні генотипи та алелі впливу не мали ($p>0,05$). Але такий вплив було виявлено у відношенні розвитку артеріальної гіпертензії і для генотипів, і для алелей. Переважна кількість носіїв предкового алеля *C rs6842241* не мали артеріальної гіпертензії ($f=0,676$), тоді як більшість носіїв мінорного алеля *A rs6842241* ($f=0,818$) це ускладнення мали ($p<0,001$).

Такі результати продиктували необхідність з'ясування впливу поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* на рівень артеріального тиску у групах хворих (табл. 5.14).

Таблиця 5.14

Вплив генотипів *rs6842241* гена *EDNRA* на клінічні і розрахункові показники; Me (Q1; Q3)

Показники	Генотипи			Н	p
	<i>C/C</i> , n=84	<i>C/A</i> , n=48	<i>A/A</i> , n=20		
АТс, мм рт. ст.	130,00 (120,00; 140,00)	142,50 (140,00; 150,00)	160,00 (160,00; 175,00)	64,10	<0,001
АТд, мм рт. ст.	80,00 (80,00; 90,00)	90,00 (85,00; 95,00)	95,00 (90,00; 100,00)	48,39	<0,001
ІМТ, кг/м ²	28,41 (24,57; 32,50)	30,94 (28,11; 35,03)	34,36 (29,74; 38,08)	17,68	<0,001
ІТХ, ум.од.	5,02 (3,23; 7,41)	7,15 (4,18; 9,16)	8,27 (5,83; 10,03)	17,29	<0,001

Показано, що поліморфні генотипи мали вплив на величину артеріального систолічного і діастолічного тисків – за наявності мінорного генотипу *A/A* величини тиску були достеменно вищими за інші генотипи ($p<0,001$). Крім того, поліморфізм *rs6842241* гена *EDNRA* мав вплив на величину ІМТ і ІТХ – також у носіїв мінорного генотипу *A/A* ці показники

були вищими ($p < 0,001$). Було також показано достеменність впливу алелей на ті самі показники – алель ризику *A rs6842241* достеменно сприяв більшим величинам ІМТ (на 9,4%), АТ_С (на 19,2%) і АТ_Д (на 12,5%) та ІТХ (на 35,2%; для всіх випадків $p < 0,001$) у порівнянні з алелем *C*. Цім і міг пояснюватися зв'язок поліморфізму з розвитком артеріальної гіпертензії.

Таким чином, було показано, що у носіїв мінорного алеля *A* (генотипи *C/A* і *A/A*) поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* перебіг діабету був гіршим (за ІТХ), більшість хворих мала зайву вагу або ожиріння та артеріальну гіпертензію.

Також було встановлено, що у носіїв генотипу ризику *A/A rs6842241* були виявлені значно вищі рівні у крові ліпопротеїдів низької щільності: на 145% у порівнянні з носіями гетерозиготного генотипу *C/A* та – на 47,9% у порівнянні з носіями предкового генотипу *C/C* ($p = 0,037$). У носіїв алеля ризику *A* значно вище був рівень у крові тригліцеридів (на 40,6%; $p = 0,033$), ніж у носіїв алеля *C*. Такий зв'язок з маркерами порушення жирового обміну висвітлював й можливу атерогенну дію поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA*.

В окремої серії розрахунків була показана відсутність впливу поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* на маркери вуглеводного обміну (рівень глікемії, вміст у крові HbA1c, інсуліну, а також індекси інсулінорезистентності) і клініко-лабораторні показники, що асоціюються з функцією нирок (рівні у крові сечовини, креатиніну, а також величини діурезу, швидкість клубочкової фільтрації, альбумін- і глюкозурії) – для всіх випадків $p > 0,05$.

Розподіл генотипів *rs5351* гена *EDNRB* у контрольній групі (рис. 5.4) також було порівняно з даними Програми 1000 Genomes Project Phase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>). Для визначення частот генотипів *rs5351* гена *EDNRB* у Програмі було залучено 2504 людини. Предковий генотип *C/C* був визначений з частотою 0,316 (у наших дослідженнях – 0,34), гетерозигота *C/T* – 0,457 (у наших дослідженнях – 0,53), мутантна гомозигота *T/T* – 0,227 (у наших дослідженнях – 0,13); у європейській популяції ($n = 503$)

показники склали, відповідно, 0,421; 0,439 та 0,139.

Порівняння розподілу алелей *rs5351* гена *EDNRB* у контрольній групі з даними Програми 1000 Genomes Project Phase 3 показало, що у всіх спостереженнях (n=5008) предковий алель *C* був визначений з частотою 0,545 (у наших дослідженнях – 0,60), мутантний алель *A* – 0,455 (у наших дослідженнях – 0,40); для європейської популяції (n=1006) показники склали, відповідно, 0,641 та 0,359.

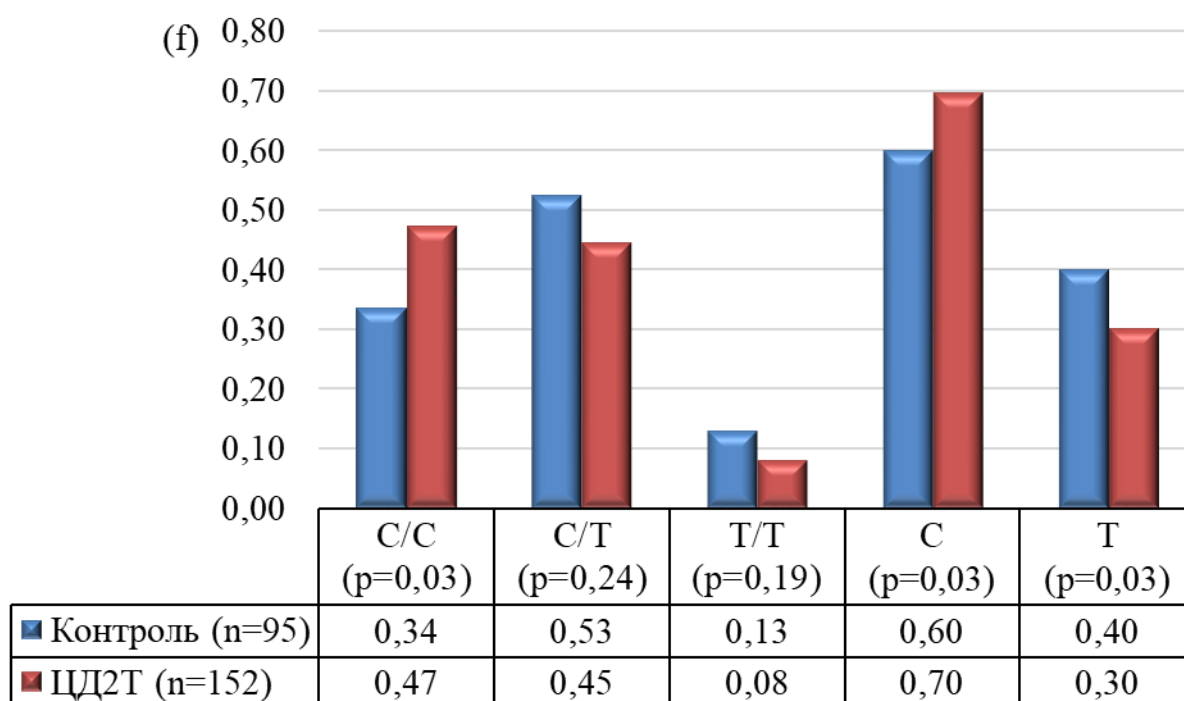


Рис. 5.4. Розподіл частот генотипів и алелей *rs5351* гена *EDNRB* між контрольною групою пацієнтів і групою хворих на ЦД2Т та статистична значущість розбіжностей частот між групами за критерієм *Fet2*.

От же, наші результати по розподілу генотипів і алелей поліморфізму *rs5351* гена *EDNRB* збігалися з результатами Програми 1000 Genomes Project Phase 3, особливо – для європейської популяції.

У хворих на ЦД2Т в порівнянні з контролем (див. рис. 5.4) було відмічено статистично значуще збільшення частоти предкового гомозиготного генотипу *C/C* (p=0,03) та алеля *C* (p=0,03) при зменшенні

частоти мінорного алеля T ($p=0,03$).

Таким чином, розподіл генотипу C/C і алелей $rs5351$ гена $EDNRB$ у хворих відрізнявся від контрольної групи. Надалі це було перевірено при визначенні впливу частот генотипів і алелей на наявність захворювання (табл. 5.15).

Таблиця 5.15

**Розподіл частот генотипів і алелей $rs5351$ гена $EDNRB$
і ступінь їх асоціації з ЦД2Т**

Генотипи Алелі	ЦД2Т, n (f)	Контроль, n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
C/C	72 (0,474)	32 (0,337)	5,30	0,071	1,77	1,04-3,01
C/T	68 (0,447)	50 (0,526)			0,73	0,44-1,22
T/T	12 (0,079)	13 (0,137)			0,54	0,24-1,24
C	221 (0,697)	114 (0,600)	4,94	0,026	1,54	1,05-2,25
T	92 (0,303)	76 (0,400)			0,65	0,45-0,95

Аналіз впливу генотипів поліморфізмів $rs5351$ гена $EDNRB$ за таблицею спряженості (3×3) показав відсутність статистичної значущості їх зв'язку з ЦД2Т ($\chi^2=5,30$; $p=0,071$). На відміну від цього, порівняння частот алелей за таблицею спряженості (2×2) показало наявність впливу алельного поліморфізму ($\chi^2=4,94$; $p=0,026$) на ЦД2Т. Предковий алель C підвищував ризик його розвитку у 1,5 рази (ВШ=1,54; 95% ВІ 1,05-2,25), тоді як мінорний алель T – знижував (ВШ=0,65; 95% ВІ 0,45-0,95).

Такий результат був не досить звичайним, оскільки, як показали дослідження інших поліморфізмів, мінорні алелі і були алелями ризику розвитку ЦД2Т та його ускладнень. Зв'язок предкового алеля C з розвитком захворювання вказував на протективний ефект саме мутації $rs5351$ та потребував подальшого дослідження.

З нашої точки зору, враховуючи, що роль цього рецептору проявляється за умов фізіологічних концентрації ET1, в умовах його

надмірного синтезу при ЦД2Т мутантний алель *T* гена *EDNRB* може сприяти меншій експресії ET1, тобто – обмеженню його патологічного ефекту.

Таким чином було встановлено, що поліморфізм *rs5351* гена *EDNRB* мав зв'язок з розвитком ЦД2Т – алелем ризику виявився предковий алель *C*.

Для з'ясування спадкової ролі алелей було проведено порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування. Результати розрахунку розподілу генотипів поліморфізму *rs5351* та генетичного ризику захворювання представлені у таблиці 5.16.

Таблиця 5.16

Вплив розподілу частот генотипів *rs5351* гена *EDNRB* на розвиток ЦД2Т і ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи	ЦД2Т (n=152), n (f)	Контроль (n=95), n (f)	χ^2	p	ВШ	95% ВІ
Домінантна модель успадкування						
<i>C/C+C/T</i>	140 (0,92)	82 (0,86)	2,15	0,142	1,85	0,81 – 4,24
<i>T/T</i>	12 (0,08)	13 (0,14)			0,54	0,24 – 1,24
Рецесивна модель успадкування						
<i>C/C</i>	72 (0,47)	32 (0,34)	4,49	0,034	1,77	1,04 – 3,01
<i>C/T+T/T</i>	80 (0,53)	63 (0,66)			0,56	0,33 – 0,96

Розподіл генотипів *rs5351* за домінантною моделлю успадкування (*C/C* проти *C/T+T/T*) не мав статистичної значущості: $\chi^2=2,15$; $p=0,142$, тоді як розподіл генотипів за рецесивною моделлю успадкування був значущим: $\chi^2=4,49$; $p=0,034$. Цей результат підтвердив асоціацію з ЦД2Т за умов наявності у генотипі предкового алеля *C* (*C/C+C/T*) для якого ризик розвитку захворювання був у 1,8 рази вище (ВШ=1,77; 95% ВІ 1,04-3,01), ніж для носіїв генотипу *T/T*.

Таким чином, було показано, що при ЦД2Т у хворих з української популяції збільшувалася частота предкового генотипу *C/C* і алеля *C* та зменшувалася частота мінорного алеля *T* ($p=0,03$); поліморфізм *rs5351* гена

EDNRB був пов'язаний з розвитком захворювання, а генотипи з предковим алелем *C* (*C/C* і *C/T*) у 1,8 рази збільшували ризик ЦД2Т у порівнянні з носіями генотипу *T/T* ($p=0,034$).

Як і для розподілу генотипів та алелей поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA*, не було показано впливу поліморфізму *rs5351* гена *EDNRB* на розподіл хворих на групи, що, вказувало на відсутність зв'язку цих поліморфізмів з тяжкістю захворювання. А ні для генотипів, а ні для алелей *rs5351* такого впливу встановлено не було (відповідно, $p=0,821$ і $0,692$). Також було показано, що поліморфізм *rs5351* гена *EDNRB* не мав значення для ступеня компенсації вуглеводного обміну, оціненого за рівнем глікемії і HbA1c у носіїв різних генотипів ($p>0,05$ для всіх порівнянь).

Надалі був з'ясований вплив генотипу поліморфізму *rs5351* гена *EDNRB* на наявність діабетичних ускладнень. На діабетичну ретинопатію, діабетичну макроангіопатію нижніх кінцівок та артеріальну гіпертензію поліморфні генотипи та алелі впливу не мали ($p>0,05$). Такий вплив і для генотипів і для алелей було виявлено у відношенні розвитку діабетичної полінейропатії, діабетичної нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації та за рівнем альбумінурії.

Переважає кількість носіїв предкового алеля *C rs5351* мали діабетичну полінейропатію ($f=0,958$), діабетичну нефропатію за швидкістю клубочкової фільтрації ($f=0,708$) та за рівнем альбумінурії ($f=0,676$), тоді як більшість носіїв мінорного алеля *T rs5351* таких ускладнень не мали (відповідно, $f=0,750$, $f=1,000$ і $f=0,833$).

Відповідно, для алелей *rs5351* гена *EDNRB* статистично значущий вплив був визначений для розвитку сенсорної полінейропатії ($\chi^2=7,54$; $p=0,006$), нефропатії за показниками швидкості клубочкової фільтрації ($\chi^2=25,48$; $p<0,001$) і за рівнем альбумінурії ($\chi^2=32,27$; $p<0,001$), на інші ускладнення розподіл алелей впливу не мав. При цьому, за наявністю алеля *C* перелічені ускладнення достеменно виявлялися частіше, ніж – мінорного алеля *T* (відповідно, 0,915 проти 0,804; 0,608 проти 0,293 і 0,915 проти 0,652).

Серед клінічних показників хворих, поліморфізм *rs5351* був достеменно пов'язаний з довшою тривалістю захворювання: на час залучення до програми дослідження носії генотипу *C/C* хворіли на два роки довше, ніж носії генотипу *C/T* і на сім років довше ніж носії генотипу *T/T* ($p=0,008$) та мали більшу величину ІТХ: на 26,3 % у порівнянні з носіями генотипу *C/T* і на 74,1 % у порівнянні з носіями генотипу *T/T* ($p<0,001$).

Відповідно, носії алеля *C* хворіли на три роки довше, ніж носії алеля *T*; $p=0,006$) та мали більшу величину ІТХ (на 44,4%; $p<0,001$). Отже, можна було зробити висновок, що, в цілому, носії предкового алеля *C rs5351* гена *EDNRB* захворювали на ЦД2Т раніше та мали більшу тяжкість хвороби, ніж носії мутантного алеля *T*.

Зв'язок поліморфізму *rs5351* гена *EDNRB* з розвитком нефропатії продиктував необхідність визначення впливу на показники, що асоціюються з функцією нирок. Встановлено, що у носіїв алеля ризику *C rs5351* були виявлені більші рівні у крові сечовини (на 5,6 %; $p=0,044$), креатиніну (на 7,6 %; $p=0,018$), альбумінурії (на 37,0 %; $p<0,001$) та менший рівень швидкості клубочкової фільтрації (на 16,0 %; $p<0,001$), ніж у носіїв алеля *T*.

Такі ж самі результати було відмічено і для генотипів: носії генотипу *C/C* мали більший рівень у крові креатиніну (на 7,4 %, ніж носії генотипу *C/T* і на 9,1 % ніж носії генотипу *T/T*; $p=0,030$) та значення альбумінурії (на 7,3 % у порівнянні з носіями генотипу *C/T* і на 74,9 % у порівнянні з носіями генотипу *T/T*; $p=0,001$), а також – меншу величину швидкості клубочкової фільтрації (на 18,0 % у порівнянні з носіями генотипу *C/T* і на 35,7 % у порівнянні з носіями генотипу *T/T*; $p<0,001$).

Отже патогенетична роль предкового алеля ризику *C* проявлялася у збільшенні рівнів сечовини, креатиніну, альбумінурії та зменшенні швидкості клубочкової фільтрації, що й пояснювало зв'язок цього поліморфізму із розвитком нефропатії у хворих на ЦД2Т.

Також як і для поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* для *rs5351* гена *EDNRB* була показана відсутність впливу на маркери вуглеводного обміну

(рівень глікемії, вміст у крові HbA1c і інсуліну), а також на індекси інсулінорезистентності ($p > 0,05$ для всіх порівнянь). Крім того, на відміну від *rs6842241* гена *EDNRA*, поліморфізм *rs5351* гена *EDNRB* не мав зв'язків з маркерами жирового обміну (рівнями у крові холестерину, ЛПНЩ та тригліцеридів; $p > 0,05$ для всіх порівнянь).

Іспанські дослідники [169] встановили, що деякі поліморфізми в системі генів ендотелінових рецепторів можуть бути пов'язані з ожирінням. Такий результат був підтверджений у відношенні поліморфізму *rs5351* гена *EDNRB*, який сприяв зниженню ризику ожиріння. У наших дослідженнях, цей поліморфізм не мав зв'язку з ІМТ та маркерами жирового обміну (на відміну від поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA*).

Надалі було проаналізовано зв'язок поліморфізмів *rs6842241* гена *EDNRA* і *rs5351* гена *EDNRB* з чинниками ЕДФ. Як було з'ясовано, крім ET1, інші чинники (NOx, eNOS, TNF α і ДК) такого зв'язку не мали ($p > 0,05$ для всіх порівнянь). Зв'язок обох поліморфізмів (для алелей) з рівнями у крові ET1 наведено у таблиці 5.17.

Таблиця 5.17

Вплив алелей на вміст у крові ET1 (фмоль/мл); Me (Q1; Q3)

Поліморфізм	Алелі		U	p
<i>rs6842241</i> гена <i>EDNRA</i>	C (n=216)	A (n=88)	6704	5,6e-06
	2,20 (1,93; 2,51)	2,44 (2,10; 2,85)		
<i>rs5351</i> гена <i>EDNRB</i>	C, n=212	T, n=92	6636	1,0e-05
	2,32 (2,02; 2,68)	2,01 (1,87; 2,44)		

Як і можна було очікувати, за наявності алелей ризику A *rs6842241* і C *rs5351* рівень ET1 був достеменно вищим: відповідно, на 10,9% ($p = 5,6e-06$) та 15,4% ($p = 1,0e-05$). Такі дані підтвердили патогенетичний зв'язок ризикових алелей з підвищенням рівню у крові основного чиннику ЕДФ – ET1.

У таблиці 5.18 наведені результати вивчення манжеткової проби РЛК у

хворих на ЦД2Т у залежності від алельного поліморфізму генів ендотелінових рецепторів. Як свідчили отримані дані, статистично значущий вплив на частоту хворих з різним балом проби РЛК мали обидва поліморфізми: для *rs6842241* $\chi^2=7,52$ ($p=0,045$) і для *rs5351* $\chi^2=13,37$ ($p=0,004$).

Таблиця 5.18

Вплив алелей на результати проби РЛК у хворих

Алелі		Бали проби РЛК				χ^2	p
		1 бал, n (f)	2 бали, n (f)	3 бали, n (f)	4 бали, n (f)		
<i>rs6842241</i> <i>EDNRA</i>	C	24 (0,923)	67 (0,728)	73 (0,689)	52 (0,650)	7,52	0,045
	A	2 (0,077)	25 (0,272)	33 (0,311)	28 (0,350)		
<i>rs5351</i> <i>EDNRB</i>	C	13 (0,500)	66 (0,609)	79 (0,745)	64 (0,800)	13,37	0,004
	T	13 (0,500)	36 (0,391)	27 (0,255)	16 (0,200)		

В обох випадках спостерігалася аналогічна тенденція: частота хворих з високим балом проби РЛК поступово збільшувалася у носіїв ризикових алелей: для носіїв алеля A *rs6842241* – з 0,077 при РЛК=1 бал до 0,350 при РЛК=4 бали; для носіїв алеля C *rs5351* – з 0,500 при РЛК=1 бал до 0,800 при РЛК=4 бали. На нашу думку, це безпосередньо підтверджувало патогенну роль ризикових алелей генетичних поліморфізмів *rs6842241* і *rs5351* для розвитку ЕДФ.

Таким чином, проведене дослідження висвітлює патогенетичну роль ET1 та поліморфізмів його рецепторів, які були асоційовані з більшою експресією ET1. Через безпосередній вплив на клініко-лабораторні показники та розвиток ускладнень у хворих на ЦД2Т поліморфізми *rs6842241* гена *EDNRA* (алель ризику – мінорний алель A) та *rs5351* гена *EDNRB* (алель ризику – предковий алель C) погіршували тяжкість хвороби та сприяли прогресуванню ЕДФ.

Резюме. У хворих на ЦД2Т з української популяції розподіл алелей *rs1799983* був пов'язаний з розвитком захворювання ($\chi^2=5,82$; $p=0,016$). Наявність у генотипі мінорного алеля *T* збільшувало у 1,6 рази (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32) шанси розвитку ЦД2Т. Зв'язок з захворюванням за домінантною моделлю успадкування (*G/G* проти *G/T+T/T*) показав, що патогенна дія *rs1799983* проявлялася за умов наявності у генотипі мінорного алеля *T* (ВШ=1,92; 95% ВІ 0,94-3,93; $p=0,045$). Наявність алеля *T* сприяла декомпенсації ЦД2Т за ступенем глікування білка (більший рівень HbA1c), погіршенню функції нирок (збільшенню рівню у крові креатиніну, альбумінурії та зменшенню швидкості клубочкової фільтрації), що могло бути пов'язаним з меншим рівнем у крові стабільних метаболітів NO та eNOS. Саме це обумовлювало вплив алеля *T* на наявність нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації ($\chi^2=8,00$; $p=0,005$) і за рівнем альбумінурії ($\chi^2=4,81$; $p=0,028$) та обґрунтовувало її вплив на наявність артеріальної гіпертензії ($\chi^2=4,74$; $p=0,029$).

Дослідження показало, що в українській когорті хворих на ЦД2Т розподіл алелей *rs1800629* гена *TNF α* був пов'язаний з розвитком захворювання ($\chi^2=5,91$; $p=0,015$). Мінорний алель *A* збільшував у 1,7 рази (ВШ=1,71; 95% ВІ 1,11-2,65) шанси розвитку ЦД2Т. Зв'язок з захворюванням за домінантною моделлю успадкування (*G/G* проти *G/A+A/A*) довів, що патогенна дія *rs1800629* проявлялася саме за умов наявності у генотипі мінорного алеля *A* (ВШ=1,87; 95% ВІ 1,10-3,18; $p=0,020$). Наявність алеля *A* сприяло зменшенню клубочкової фільтрації, що пояснювало зв'язок *rs1800629* із розвитком нефропатії ($\chi^2=6,38$; $p=0,041$) та було обумовлено розвитком ЕДФ з високими рівнями у крові *TNF α* ($p<0,001$), ET1 ($p=0,026$) і NO ($p<0,001$).

Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів мали зв'язок з розвитком ЦД2Т: для *rs6842241* гена *EDNRA* підвищення ризику було асоційовано з мінорним алелем *A* ($p=0,005$); для *rs5351* гена *EDNRB* – з предковим алелем

C ($p=0,026$). Наявність цих алелей сприяло достеменно більш високому рівню у крові ЕТ1 ($p<0,001$) та більшій вираженості ЕДФ за результатами проби РЛК ($p<0,05$). Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів мали значення для розвитку ускладнень ЦД2Т: *rs6842241* – для артеріальної гіпертензії, а *rs5351* – сенсорної полінейропатії і нефропатії (для всіх випадків $p<0,001$). При цьому алель ризику *A rs6842241* сприяв більшим величинам ІМТ, систолічного і діастолічного тиску, ІТХ та рівню у крові тригліцеридів у порівнянні з алелем *C* (для всіх випадків $p<0,001$). Носії алеля ризику *C rs5351* хворіли на три роки довше, ніж носії алеля *T* ($p=0,006$) та мали більший ІТХ ($p<0,001$); у них були більші рівні у крові сечовини і креатиніну, мікроальбумінурії та менша швидкість клубочкової фільтрації, ніж у носіїв алеля *T* (для всіх випадків $p<0,05$).

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступних публікацій [9, 13, 15, 18, 20, 21, 23].

РОЗДІЛ 6

ПРОГНОЗУВАННЯ РОЗВИТКУ УСКЛАДНЕНЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-го ТИПУ ТА ЙОГО ТЯЖКОСТІ З УРАХУВАННЯМ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ТА ЧИННИКІВ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ

Практичне використання результатів молекулярно-генетичних досліджень, як правило реалізується через побудову математичних моделей, здатних прогнозувати розвиток захворювання або його ускладнень [250]. Висока точність і довгострокова актуальність таких прогнозів ґрунтується, перш за все, на стабільності і незмінності протягом життя генотипу людини.

Результати проведеного дослідження в цілому підтвердили наявність асоціативного зв'язку між поліморфними генотипами генів *NOS3*, *TNFα*, *EDNRA* і *EDNRB* і розвитком діабетичних ускладнень у хворих ЦД2Т, таких як ретинопатія, сенсорна полінейропатія, нефропатія (за швидкістю клубочкової фільтрації і альбумінурії), артеріальна гіпертензія і макроангіопатія нижніх кінцівок. У зв'язку з цим, здавалося цілком доцільним розробити математичні моделі для вирішення найголовніших діагностичних завдань: прогнозування ймовірності розвитку ускладнень шляхом визначення значущого впливу індивідуальних комбінацій генотипів та прогнозування тяжкості перебігу ЦД2Т.

6.1. Прогнозування розвитку ускладнень з урахуванням генетичного поліморфізму

Для розробки математичних моделей прогнозування ймовірності розвитку діабетичних ускладнень виконана серія багатфакторних логістичних регресійних розрахунків з використанням пакета GLZ. У якості

предикторів використали індикаторні значення, прийняті для вивчених поліморфізмів *rs1799983*, *rs1800629*, *rs6842241* і *rs5351*. Як залежні змінні у моделях прогнозування для рішення цього завдання були використані біномінальні категоріальні показники, які кодували наявність або відсутність одного з ускладнень (див. табл. 2.4). В аналіз були включені всі хворі даного дослідження (152 особи).

Розрахунок ймовірності розвитку діабетичної ретинопатії

В результаті аналізу статистичних характеристик безперервних предикторів для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної ретинопатії (табл. 6.1) були відібрані змінні *TNF α* і *EDNRB*, β -коефіцієнти яких вірогідно відрізнялися від нульової гіпотези ($p=0,031$ і $p=0,007$, відповідно).

Таблиця 6.1

Коефіцієнти регресійного рівняння та їх значущість для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної ретинопатії

Змінні регресії	$\beta \pm SE$	Wald	p
<i>TNFα</i>	0,445 \pm 0,206	4,667	0,031
<i>EDNRB</i>	-0,557 \pm 0,207	7,257	0,007
Вільний показник	11,373 \pm 3,053	7,742	0,005

β -коефіцієнти для цих показників в абсолютному вираженні вказували на більший ваговий внесок «*EDNRB*» в розрахунок залежної змінної у порівнянні з «*TNF α* »: $|-0,557| > |0,445|$, а знаки β -коефіцієнтів вказали на наявність прямого зв'язку з результуючою змінною для «*TNF α* » і зворотного – для «*EDNRB*».

Регресійне рівняння для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної ретинопатії ($P_{(PI)}$) мало вигляд:

$$P_{(PI)} = 1 / (1 + e^{-(11,372 + 0,445 * TNF\alpha - 0,557 * EDNRB)}) \quad (6.1),$$

де *TNF α* – індикаторне значення генотипу *rs1800629*;

EDNRB – індикаторне значення генотипу *rs5351*.

За результатами ROC-аналізу операційні характеристики моделі мали задовільні властивості: $AUC=0,638\pm0,035$ ($p=1,8e-04$); $-2*\log(\text{Likelihood}) = 164,29$ при $\chi^2=13,50$ ($p=0,001$).

З'ясування оптимальної точки відсікання (cut-off) – точки рівноваги на ймовірнісному графіку чутливості, специфічності і правильності встановлює межеве значення ймовірності, яке розділяє негативний і позитивний результати настання досліджуваної події. Для даної моделі в якості межового значення була прийнята ймовірність $P_{(PI)}=0,491$. Збіг прогнозу і фактичних даних для позитивних прогнозів склав 68,1 %; для негативних – 51,6 %; правильність прогнозування моделі в цілому – 64,5 %.

Негативний проноз визначали такі комбінації генотипів *rs1800629* і *rs5351* – *G/G+T/T*, *G/A+T/T*, *G/G+C/T*, *A/A+T/T* і *G/A+C/T*; позитивний – *G/G+C/C*, *A/A+C/T*, *G/A+C/C* і *A/A+C/C*. Комбінації генотипів, які містили ризикові алелі (*A+C*) мали високу ймовірність розвитку ускладнення, тоді як комбінації з перевагою протективних алелей (*G+T*) – ймовірність нижчу за межеве значення (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Класифікація результатів прогнозування розвитку діабетичної ретинопатії в залежності від генотипів *rs1800629* і *rs5351*

Генотипи		$P_{(PI)}$	Прогноз (n=152)		Фактичні (n=152)		p	
<i>TNF</i>	<i>EDNRB</i>		N, n (f)	Y n (f)	N, n (f)	Y, n (f)	N	Y
<i>G/G</i>	<i>T/T</i>	0,258	11 (0,072)	0 (0,000)	3 (0,020)	8 (0,053)	0,051	0,007
<i>G/A</i>	<i>T/T</i>	0,352	1 (0,007)	0 (0,000)	1 (0,006)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/G</i>	<i>C/T</i>	0,378	37 (0,243)	4 (0,026)	11(0,072)	30 (0,197)	<0,001	<0,001
<i>G/A</i>	<i>C/T</i>	0,487	9 (0,059)	9 (0,059)	5 (0,033)	13 (0,085)	0,413	0,507
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	0,515	9 (0,059)	17 (0,112)	5 (0,033)	21 (0,176)	0,413	0,603
<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,597	1 (0,007)	8 (0,053)	2 (0,013)	7 (0,059)	1,000	1,000
<i>G/A</i>	<i>C/C</i>	0,624	5 (0,033)	35 (0,230)	6 (0,039)	34 (0,286)	1,000	1,000
<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,721	0 (0,000)	6 (0,039)	0 (0,000)	6 (0,050)	-	1,000

Розрахунок ймовірності розвитку діабетичної полінейропатії

Аналіз статистичних характеристик предикторів для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної полінейропатії дозволив відібрати змінні, β -коефіцієнти яких значуще відрізнялися від нульової гіпотези (табл. 6.3), до яких були віднесені *NOS3* і *EDNRB*.

Таблиця 6.3

Коефіцієнти регресійного рівняння та їх значущість для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної полінейропатії

Змінні регресії	$\beta \pm SE$	Wald	p
<i>NOS3</i>	0,543 \pm 0,189	8,274	0,004
<i>EDNRB</i>	-0,711 \pm 0,210	11,410	<0,001
Вільний показник	17,157 \pm 2,751	10,452	0,001

Аналіз табличних даних підтвердив статистично значимий вплив обраних предикторів на результуючий показник регресійного рівняння – ймовірність розвитку діабетичної полінейропатії: «*NOS3*» – $p=0,004$; «*EDNRB*» – $p<0,001$. Абсолютні значення β -коефіцієнтів цих показників вказували на більший ваговий внесок «*EDNRB*» в розрахунок залежної змінної у порівнянні з «*NOS3*»: $|-0,711| > |0,543|$. Знаки β -коефіцієнтів вказували на наявність прямого зв'язку з результуючою змінною для «*NOS3*» і зворотного – для «*EDNRB*».

Регресійне рівняння для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної полінейропатії ($P_{(ПНП)}$) мало вигляд:

$$P_{(ПНП)} = 1 / (1 + e^{-(17,157 + 0,543 * NOS3 - 0,711 * EDNRB)}) \quad (6.2),$$

де *NOS3* – індикаторне значення генотипу *rs1799983*;

EDNRB – індикаторне значення генотипу *rs5351*.

Операційні характеристики цієї моделі мали задовільні властивості: AUC 0,671 \pm 0,035 ($p=3,0e-06$); $-2 * \log(\text{Likelihood}) = 160,22$ при $\chi^2 = 20,19$

($p=4,14e-05$).

Аналіз залежності чутливості, специфічності і правильності розробленої регресійної моделі від ймовірності розвитку діабетичної полінейропатії дозволив встановити межове значення ймовірності: $P_{(ПНП)}=0,547$. Збіг розрахункових і фактичних даних для позитивних прогнозів – 63,4 %; для негативних – 67,3 %, правильність прогнозування для моделі в цілому – 65,2 %.

Класифікаційні характеристики моделі для поєднань генотипів генів *NOS3* і *EDNRB* представлені в таблиці 6.4.

Таблиця 6.4

Класифікація результатів прогнозування розвитку діабетичної полінейропатії в залежності від генотипів *rs1799983* і *rs5351*

Генотипи		$P_{(ПНП)}$	Прогноз (n=152)		Фактичні (n=152)		p	
<i>NOS3</i>	<i>EDNRB</i>		N, n (f)	Y n (f)	N, n (f)	Y, n (f)	N	Y
<i>G/G</i>	<i>T/T</i>	0,226	4 (0,026)	0 (0,000)	1 (0,006)	3 (0,020)	0,371	0,247
<i>G/T</i>	<i>T/T</i>	0,334	6 (0,038)	0 (0,000)	2 (0,014)	4 (0,026)	0,282	0,122
<i>G/G</i>	<i>C/T</i>	0,372	17 (0,111)	2 (0,014)	4 (0,026)	15 (0,099)	0,005	0,002
<i>T/T</i>	<i>T/T</i>	0,463	1 (0,008)	1 (0,006)	0 (0,000)	2 (0,014)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>C/T</i>	0,505	19 (0,127)	14 (0,090)	8 (0,053)	25 (0,164)	0,042	0,083
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	0,547	9 (0,060)	19 (0,124)	2 (0,014)	26 (0,171)	0,061	0,333
<i>T/T</i>	<i>C/T</i>	0,637	3 (0,020)	13 (0,085)	0 (0,000)	16 (0,105)	0,247	0,697
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	0,675	5 (0,034)	24 (0,157)	1 (0,006)	28 (0,184)	0,214	0,648
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	0,782	1 (0,006)	14 (0,093)	0 (0,000)	15 (0,099)	1,000	1,000

Негативний проноз визначали такі комбінації генотипів *rs1800629* і *rs5351* – *G/G+T/T*, *G/T+T/T*, *G/G+C/T*, *T/T+T/T* і *G/T+C/T*; позитивний – *G/G+C/C*, *T/T+C/T*, *G/T+C/C* і *T/T+C/C*. Необхідно зазначити, що як і у попередньому випадку, комбінації генотипів де переважали протективні у відношенні розвитку ЦД2Т алелі (*G+T*) мали ймовірність позитивного прогнозу меншу за межову. Тоді як у комбінаціях з позитивним прогнозом переважали алелі ризику (*T+C*).

Розрахунок ймовірності розвитку діабетичної нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації

Результати розробки математичної моделі наведені у табл. 6.5.

Таблиця 6.5

Коефіцієнти регресійного рівняння та їх значущість для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної нефропатії за ШКФ

Змінні регресії	$\beta \pm SE$	Wald	p
<i>NOS3</i>	0,708 \pm 0,215	10,806	0,001
<i>TNFα</i>	0,584 \pm 0,232	6,364	0,012
<i>EDNRB</i>	-1,411 \pm 0,273	26,761	<0,001
Вільний показник	11,122 \pm 3,887	9,121	0,003

Аналіз табличних даних підтвердив статистично значимий вплив відібраних предикторів на ймовірність розвитку діабетичної нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації: «*NOS3*» (p=0,001); «*TNF α* » (p=0,012) і «*EDNRB*» (p<0,001). Абсолютні значення β -коефіцієнтів вказували на більший ваговий внесок «*EDNRB*» в розрахунок залежної змінної у порівнянні з «*NOS3*» і «*TNF α* »: $|-1,411| > |0,708| > |0,584|$. Знаки β -коефіцієнтів вказували на наявність прямого зв'язку з результуючою змінною для «*NOS3*» і «*TNF α* » і зворотного – для «*EDNRB*».

Регресійні рівняння для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної нефропатії за ШКФ ($P_{(HP \text{ ШКФ})}$) мало вигляд:

$$P_{(HP \text{ ШКФ})} = 1 / (1 + e^{-(11,121 + 0,708 * NOS3 + 0,584 * TNF\alpha - 1,411 * EDNRB)}) \quad (6.3),$$

де *NOS3* – індикаторне значення генотипу *rs1799983*;

TNF α – індикаторне значення генотипу *rs1800629*;

EDNRB – індикаторне значення генотипу *rs5351*.

Операційні характеристики даної моделі, що були розраховані у ROC-аналізі мали задовільні характеристики: AUC=0,784 \pm 0,029 (p=7,5e-13); -2*log

(Likelihood)=127,26 при $\chi^2=53,55$ ($p=0,0e-01$).

Межове значення, при збільшенні якого ставав можливим розвиток цього ускладнення склало: $P_{(НП\ ШКФ)}=0,290$. При цьому збіг розрахункових і фактичних даних для позитивних прогнозів склав 74,4 %; для негативних – 71,0 %; правильність прогнозування для моделі в цілому – 70,9 %. Класифікаційні характеристики моделі представлені в таблиці 6.6.

Таблиця 6.6

**Класифікація результатів прогнозування розвитку
діабетичної нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації
в залежності від генотипів *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351***

Генотипи			$P_{(НП\ ШКФ)}$	Прогноз (n=152)		Фактично (n=152)		p	
<i>NOS3</i>	<i>TNFα</i>	<i>EDNRB</i>		N, n (f)	Y, n (f)	N, n (f)	Y, n (f)	N	Y
<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>T/T</i>	0,024	4 (0,026)	0 (0,000)	4 (0,026)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/T</i>	<i>G/G</i>	<i>T/T</i>	0,047	5 (0,033)	0 (0,002)	5 (0,033)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/T</i>	<i>G/A</i>	<i>T/T</i>	0,081	1 (0,006)	0 (0,001)	1 (0,006)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>C/T</i>	0,090	11 (0,072)	1 (0,006)	11 (0,072)	1 (0,006)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>G/G</i>	<i>T/T</i>	0,091	1 (0,006)	1 (0,006)	2 (0,013)	0 (0,000)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	<i>C/T</i>	0,151	4 (0,026)	2 (0,012)	5 (0,033)	1 (0,006)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>G/G</i>	<i>C/T</i>	0,168	10 (0,066)	7 (0,046)	9 (0,059)	6 (0,039)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,242	1 (0,006)	0 (0,003)	1 (0,006)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/T</i>	<i>G/A</i>	<i>C/T</i>	0,266	4 (0,026)	5 (0,033)	6 (0,039)	3 (0,020)	0,750	0,723
<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	0,290	4 (0,026)	7 (0,046)	2 (0,013)	9 (0,059)	0,684	0,798
<i>T/T</i>	<i>G/G</i>	<i>C/T</i>	0,291	3 (0,020)	9 (0,059)	5 (0,033)	7 (0,046)	0,723	0,798
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,394	2 (0,012)	5 (0,033)	2 (0,013)	5 (0,033)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	<i>C/C</i>	0,422	3 (0,020)	11 (0,072)	7 (0,046)	8 (0,053)	0,335	0,637
<i>T/T</i>	<i>G/A</i>	<i>C/T</i>	0,424	1 (0,006)	2 (0,016)	0 (0,000)	3 (0,020)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	0,453	2 (0,010)	6 (0,042)	4 (0,026)	4 (0,026)	0,684	0,750
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,567	0 (0,002)	3 (0,020)	0 (0,000)	3 (0,020)	-	1,000
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,569	0 (0,001)	1 (0,006)	0 (0,000)	1 (0,006)	-	1,000
<i>G/T</i>	<i>G/A</i>	<i>C/C</i>	0,597	2 (0,012)	16 (0,105)	5 (0,033)	13 (0,085)	0,448	0,697
<i>T/T</i>	<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	0,627	0 (0,002)	6 (0,039)	0 (0,000)	6 (0,039)	-	1,000
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,727	0 (0,001)	2 (0,012)	1 (0,006)	1 (0,006)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>G/A</i>	<i>C/C</i>	0,751	0 (0,002)	8 (0,053)	1 (0,006)	7 (0,046)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,844	0 (0,000)	1 (0,006)	0 (0,000)	1 (0,007)	-	1,000

Негативний проноз визначали такі комбінації генотипів *rs1799983*,

rs1800629 і *rs5351*: – $G/G+G/G+T/T$, $G/T+G/G+T/T$, $G/T+G/A+T/T$, $G/G+G/G+C/T$, $T/T+G/G+T/T$, $G/G+G/A+T/T$, $G/T+G/G+C/T$, $G/G+A/A+C/T$, $G/T+G/A+C/T$, $G/G+G/G+C/C$; позитивний – $T/T+G/G+C/T$, $G/T+A/A+C/T$, $G/G+G/A+C/C$, $T/T+G/A+C/T$, $G/T+G/G+C/C$, $G/G+A/A+C/C$, $T/T+A/A+C/T$, $G/T+G/A+C/C$, $T/T+G/G+C/C$, $G/T+A/A+C/C$, $T/T+G/A+C/C$, $T/T+A/A+C/C$ (табл. 6.6).

Як і у попередніх випадках, комбінації генотипів де переважали протективні у відношенні розвитку ЦД2Т алелі ($G+G+T$) мали ймовірність позитивного прогнозу меншу за межову, а у комбінаціях з позитивним прогнозом переважали алелі ризику ($T+A+C$).

Розрахунок ймовірності розвитку діабетичної нефропатії за мікроальбумінурією

Результати розробки цієї математичної моделі наведені у табл. 6.7. В процесі розробки моделі прогнозування були відібрані три предиктори, β -коефіцієнти яких значуще відрізнялися від нульової гіпотези.

Таблиця 6.7

Коефіцієнти регресійного рівняння та їх значущість для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної нефропатії за мікроальбумінурією

Змінні регресії	$\beta \pm SE$	Wald	p
<i>NOS3</i>	0,604 \pm 0,201	9,001	0,003
<i>EDNRA</i>	0,609 \pm 0,217	7,857	0,005
<i>EDNRB</i>	-1,242 \pm 0,239	27,500	<0,001
Вільний показник	3,100 \pm 3,343	7,102	0,008

Аналіз табличних даних підтвердив статистично значимий вплив обраних предикторів на ймовірність розвитку діабетичної нефропатії за мікроальбумінурією: «*NOS3*» – $p=0,003$; «*EDNRA*» – $p=0,005$; «*EDNRB*» – $p<0,001$. Вагові вклади предикторів в прогнозування ускладнення від максимального до мінімального представлені наступним рядом: «*EDNRB*»= $-1,242|$ >«*EDNRA*»= $0,609|$ >«*NOS3*»= $0,604|$. Прямий зв'язок з

результуючою змінною мали «*NOS3*» і «*EDNRA*», а зворотний – «*EDNRB*». Розроблена модель розрахунку ймовірності розвитку діабетичної нефропатії за МАУ ($P_{(НП\ МАУ)}$) описувалася таким регресійним рівнянням:

$$P_{(НП\ МАУ)} = 1 / (1 + e^{-(3,100 + 0,604 * NOS3 + 0,609 * EDNRA - 1,242 * EDNRB)}) \quad (6.4),$$

де *NOS3* – індикаторне значення генотипу *rs1799983*;

EDNRA – індикаторне значення генотипу *rs6842241*;

EDNRB – індикаторне значення генотипу *rs5351*.

ROC-аналіз даної моделі мав такі характеристики: $AUC = 0,741 \pm 0,31$ ($p = 5,7e-11$); показник максимальної правдоподібності - $2 * \log(\text{Likelihood}) = 147,43$ при $\chi^2 = 47,34$ ($p = 0,0e-01$). Перелічені параметри визначали задовільні властивості розробленої моделі.

Аналіз залежності чутливості, специфічності і правильності розробленої регресійної моделі від ймовірності розвитку діабетичної нефропатії за мікроальбумінурією встановив, що межеве значення, при збільшенні якого стає можливим розвиток ускладнення склало $P_{(НП\ МАУ)} = 0,526$; збіг розрахункових і фактичних даних для позитивних прогнозів – 79,5 %, для негативних – 64,2 %; правильність прогнозування для моделі в цілому – 72,1 %.

Класифікаційні характеристики моделі в залежності від сполучень генотипів поліморфних генів *NOS3*, *EDNRA* і *EDNRB* представлені в табл. 6.8. Негативний проноз визначали такі комбінації генотипів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351*: *G/G+C/C+T/T*, *G/T+C/C+T/T*, *G/G+G/A+T/T*, *T/T+C/C+T/T*, *G/T+C/A+T/T*, *G/G+C/C+C/T*, *T/T+C/A+T/T*, *G/T+C/C+C/T* і *G/G+C/A+C/T*. Позитивний проноз визначали такі комбінації генотипів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351*: *T/T+C/C+C/T*, *G/T+C/A+C/T*, *G/G+A/A+C/T*, *G/G+C/C+C/C*, *T/T+C/A+C/T*, *G/T+A/A+C/T*, *G/T+C/C+C/C*, *G/G+C/A+C/C*, *T/T+C/C+C/C*, *G/T+C/A+C/C*, *G/G+A/A+C/C*, *T/T+C/A+C/C*, *G/T+A/A+C/C* і *T/T+A/A+C/C*. Комбінації генотипів де переважали протективні у відношенні

розвитку ЦД2Т алелі ($G+C+T$), мали ймовірність позитивного прогнозу меншу за межову, а у комбінаціях з позитивним прогнозом переважали алелі ризику ($T+A+C$).

Таблиця 6.8

**Класифікація результатів прогнозування розвитку
діабетичної нефропатії за мікроальбумінурією
в залежності від генотипів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351***

Генотипи			P _(HП МАУ)	Прогноз (n=152)		Фактично (n=152)		p	
<i>NOS3</i>	<i>EDNRA</i>	<i>EDNRB</i>		N, n (f)	Y, n (f)	N, n (f)	Y, n (f)	N	Y
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	0,090	3 (0,020)	0 (0,000)	3 (0,020)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	0,153	3 (0,020)	0 (0,000)	2 (0,013)	1 (0,007)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	0,154	1 (0,007)	0 (0,000)	1 (0,007)	0 (0,000)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	0,249	1 (0,007)	0 (0,000)	1 (0,007)	0 (0,000)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	0,250	3 (0,020)	0 (0,000)	3 (0,020)	0 (0,000)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	0,255	7 (0,046)	2 (0,013)	2 (0,013)	7 (0,046)	0,173	0,173
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	0,378	1 (0,007)	0 (0,000)	0 (0,000)	1 (0,007)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	0,385	12 (0,079)	6 (0,039)	5 (0,033)	13 (0,086)	0,132	0,154
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	0,387	3 (0,020)	3 (0,020)	2 (0,013)	4 (0,026)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	0,534	4 (0,026)	6 (0,039)	0 (0,000)	10 (0,066)	0,122	0,422
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	0,535	3 (0,020)	6 (0,039)	1 (0,007)	8 (0,053)	0,622	0,785
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,537	1 (0,007)	3 (0,020)	1 (0,007)	3 (0,020)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	0,543	5 (0,033)	11 (0,072)	2 (0,013)	14 (0,092)	0,448	0,677
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	0,678	1 (0,007)	5 (0,033)	0 (0,000)	6 (0,039)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,679	1 (0,007)	5 (0,033)	1 (0,007)	5 (0,033)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	0,685	3 (0,020)	15 (0,099)	1 (0,007)	17 (0,112)	0,622	0,852
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	0,686	1 (0,007)	8 (0,053)	0 (0,000)	9 (0,059)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	0,799	0 (0,000)	6 (0,039)	0 (0,000)	6 (0,039)	-	1,000
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	0,800	0 (0,000)	8 (0,053)	0 (0,000)	8 (0,053)	-	1,000
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,800	0 (0,000)	3 (0,020)	0 (0,000)	3 (0,020)	-	1,000
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	0,880	0 (0,000)	5 (0,033)	0 (0,000)	5 (0,033)	-	1,000
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,880	0 (0,000)	3 (0,020)	0 (0,000)	3 (0,020)	-	1,000
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,931	0 (0,000)	4 (0,026)	0 (0,000)	4 (0,026)	-	1,000

Розрахунок ймовірності розвитку артеріальної гіпертензії

В процесі розробки моделі прогнозування були відібрані три предиктори, β -коефіцієнти яких значуще відрізнялися від нульової гіпотези.

Результати розробки цієї математичної моделі наведені у табл. 6.9.

Таблиця 6.9

Коефіцієнти регресійного рівняння та їх значущість для розрахунку ймовірності розвитку артеріальної гіпертензії

Змінні регресії	$\beta \pm SE$	Wald	p
<i>NOS3</i>	0,798 \pm 0,301	7,037	0,008
<i>EDNRA</i>	2,380 \pm 0,393	36,615	<0,001
<i>EDNRB</i>	-0,791 \pm 0,350	5,100	0,024
Вільний показник	-242,702 \pm 57,441	17,853	<0,001

Аналіз табличних даних підтверджує статистично значимий вплив відібраних предикторів на ймовірність розвитку артеріальної гіпертензії: «*NOS3*» – $p=0,008$; «*EDNRA*» – $p<0,001$; «*EDNRB*» – $p=0,024$. Вагові вклади предикторів в прогнозування ускладнення від максимального до мінімального представлені наступним рядком: «*EDNRA*»= $|2,380| > |0,798| > |-0,791|$. Прямий зв'язок з результируючою змінною мали «*NOS3*» і «*EDNRA*», а зворотний – «*EDNRB*».

Розроблена модель розрахунку ймовірності розвитку артеріальної гіпертензії ($P_{(AG)}$) описувалася наступним регресійним рівнянням:

$$P_{(AG)} = 1 / (1 + e^{(-242,702 + 0,798 * NOS3 + 2,380 * EDNRA - 0,791 * EDNRB)}) \quad (6.5),$$

де *NOS3* – індикаторне значення генотипу *rs1799983*;

EDNRA – індикаторне значення генотипу *rs6842241*;

EDNRB – індикаторне значення генотипу *rs5351*.

Операційні характеристики даної моделі мали задовільні характеристики: $AUC=0,847 \pm 0,032$ ($p=1,6e-13$); $-2 * \log(\text{Likelihood})=153,05$ при $\chi^2=36,30$ ($p=1,0e-07$).

Аналіз залежності чутливості, специфічності і правильності розробленої регресійної моделі від ймовірності розвитку діабетичної ретинопатії встановив значення ймовірності при якій стає можливим

розвиток артеріальної гіпертензії: $P_{(AG)}=0,489$. При цьому збіг розрахункових і фактичних даних для позитивних прогнозів склав 77,5 %, для негативних – 85,2%. Правильність прогнозування для моделі в цілому – 79,6 %.

Класифікація результатів прогнозування розвитку артеріальної гіпертензії в залежності від генотипів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351* представлена в табл. 6.10.

Таблиця 6.10

Класифікація результатів прогнозування розвитку артеріальної гіпертензії в залежності від генотипів *rs1799983*, *rs6842241* и *rs5351*

Генотипи			$P_{(AG)}$	Прогноз (n=152)		Фактично (n=152)		p	
<i>NOS3</i>	<i>EDNRA</i>	<i>EDNRB</i>		N, n (f)	Y, n (f)	N, n (f)	Y, n (f)	N	Y
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	0,039	3 (0,020)	0 (0,000)	3 (0,020)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	0,083	9 (0,059)	0 (0,000)	9 (0,059)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	0,083	3 (0,020)	0 (0,000)	1 (0,007)	2 (0,013)	0,622	0,498
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	0,166	16 (0,105)	0 (0,000)	13 (0,086)	3 (0,020)	0,697	0,247
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	0,167	17 (0,112)	1 (0,007)	16 (0,105)	2 (0,013)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	0,168	1 (0,007)	0 (0,000)	0 (0,000)	1 (0,007)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	0,306	1 (0,007)	0 (0,000)	1 (0,007)	0 (0,000)	1,000	-
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	0,306	16 (0,105)	2 (0,013)	12 (0,079)	6 (0,039)	0,552	0,282
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	0,308	8 (0,053)	2 (0,013)	8 (0,053)	2 (0,013)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	0,494	5 (0,033)	1 (0,007)	3 (0,020)	3 (0,020)	0,723	0,622
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	0,495	2 (0,013)	1 (0,007)	3 (0,020)	0 (0,000)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	0,495	4 (0,026)	2 (0,013)	3 (0,020)	3 (0,020)	0,724	1,000
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	0,682	6 (0,039)	3 (0,020)	3 (0,020)	6 (0,039)	0,501	0,501
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	0,684	5 (0,033)	4 (0,026)	2 (0,013)	7 (0,046)	0,448	0,541
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	0,685	5 (0,033)	5 (0,033)	2 (0,013)	8 (0,053)	0,448	0,572
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	0,827	4 (0,026)	4 (0,026)	2 (0,013)	6 (0,039)	0,684	0,750
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	0,828	2 (0,013)	4 (0,026)	2 (0,013)	4 (0,026)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,913	1 (0,007)	3 (0,020)	0 (0,000)	4 (0,026)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	0,914	1 (0,007)	4 (0,026)	0 (0,000)	5 (0,033)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,959	1 (0,007)	2 (0,013)	0 (0,000)	3 (0,020)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	0,959	1 (0,007)	5 (0,033)	0 (0,000)	6 (0,039)	1,000	1,000
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,981	0 (0,000)	3 (0,020)	0 (0,000)	3 (0,020)	-	1,000
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	0,991	0 (0,000)	4 (0,026)	0 (0,000)	4 (0,026)	1,000	1,000

Негативний проноз визначали такі комбінації генотипів *rs1799983*,

rs6842241 і *rs5351*: $G/G+C/C+T/T$, $G/G+C/C+T/T$, $G/T+C/C+T/T$, $G/G+C/C+C/C$, $G/T+C/C+C/T$, $T/T+C/C+T/T$, $G/G+C/A+T/T$, $G/T+C/C+C/G$ і $T/T+C/C+C/T$; позитивний – $G/G+C/A+C/T$, $G/T+C/A+T/T$, $T/T+C/C+C/C$, $G/G+C/A+C/C$, $G/T+C/A+C/T$, $T/T+C/A+T/T$, $G/T+C/A+C/C$, $T/T+C/A+C/T$, $G/G+A/A+C/T$, $T/T+C/A+C/C$, $G/G+A/A+C/C$, $G/T+A/A+C/T$, $G/T+A/A+C/C$ і $T/T+A/A+C/C$. Комбінації генотипів де переважали протективні у відношенні розвитку ЦД2Т алелі ($G+G+T$), мали ймовірність позитивного прогнозу меншу за межову, а у комбінаціях з позитивним прогнозом – переважали алелі ризику ($T+A+C$).

Розрахунок ймовірності розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок

В результаті розробки регресійного рівняння для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної макроангіопатії нижніх кінцівок з чотирьох предикторів були відібрані два: *NOS3* і *TNF α* , β -коефіцієнти яких значуще відрізнялися від нульової гіпотези (табл. 6.11).

Таблиця 6.11

Коефіцієнти регресійного рівняння та їх значущість для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної макроангіопатія нижніх кінцівок

Змінні регресії	$\beta \pm SE$	Wald	p
<i>NOS3</i>	0,139 \pm 0,026	28,342	<0,001
<i>TNFα</i>	0,199 \pm 0,028	48,477	<0,001
Вільний показник	-36,212 \pm 3,596	101,392	<0,001

Аналіз наведених даних підтвердив статистичну значущість відібраних предикторів у зв'язку з результуючим показником регресійного рівняння – ймовірністю розвитку діабетичної макроангіопатії нижніх кінцівок: «*NOS3*» – $p < 0,001$; «*TNF α* » – $p < 0,001$. Абсолютні значення β -коефіцієнтів для цих показників вказували на більший ваговий внесок «*TNF α* » в розрахунок залежної змінної у порівнянні з «*NOS3*»: $|0,199| > |0,139|$. При цьому обидва предиктори мали прямий (позитивний) зв'язок з результуючою змінною.

Регресійне рівняння для розрахунку ймовірності розвитку діабетичної макроангіопатії нижніх кінцівок ($P_{(МАНК)}$) представлено нижче:

$$P_{(МАНК)} = 1 / (1 + e^{(-36,212 + 0,139 * NOS3 + 0,199 * TNF\alpha)}) \quad (6.6),$$

де $NOS3$ – індикаторне значення генотипу *rs1799983*;

$TNF\alpha$ – індикаторне значення генотипу *rs1800629*.

Операційні характеристики даної моделі свідчили про задовільні обчислювальні властивості моделі: $AUC = 0,610 \pm 0,048$ ($p = 0,047$); $-2 * \log(\text{Likelihood}) = 97,12$ при $\chi^2 = 8,50$ ($p = 0,014$).

Аналіз залежності чутливості, специфічності і правильності розробленої регресійної моделі дозволив визначити оптимальну точку відсікання (cut-off), яка встановлювала граничну ймовірність, при збільшенні якої прогнозували розвиток діабетичної макроангіопатії нижніх кінцівок: $P_{(МАНК)} = 0,135$. Класифікація результатів прогнозування розвитку артеріальної гіпертензії в залежності від генотипів *rs1799983* і *rs1800629* представлені в табл. 6.12.

Таблиця 6.12

Класифікація результатів прогнозування розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок в залежності від генотипів *rs1799983* і *rs1800629*

Генотипи		$P_{(МАНК)}$	Прогноз (n=152)		Фактично (n=152)		p	
<i>NOS3</i>	<i>TNF\alpha</i>		N, n (f)	Y n (f)	N, n (f)	Y, n (f)	N	Y
<i>G/G</i>	<i>G/G</i>	0,112	27 (0,178)	0 (0,000)	20 (0,132)	0 (0,000)	0,341	-
<i>G/T</i>	<i>G/G</i>	0,126	24 (0,158)	7 (0,046)	25 (0,164)	6 (0,039)	1,000	1,000
<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	0,133	10 (0,066)	10 (0,066)	18 (0,118)	2 (0,013)	0,164	0,035
<i>T/T</i>	<i>G/G</i>	0,142	7 (0,046)	13 (0,086)	15 (0,099)	5 (0,033)	0,120	0,086
<i>G/T</i>	<i>G/A</i>	0,150	8 (0,053)	20 (0,132)	23 (0,151)	5 (0,033)	0,007	0,003
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	0,158	1 (0,007)	3 (0,020)	2 (0,013)	2 (0,013)	1,000	1,000
<i>T/T</i>	<i>G/A</i>	0,168	1 (0,007)	10 (0,066)	7 (0,046)	4 (0,026)	0,067	0,169
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	0,177	1 (0,007)	8 (0,053)	6 (0,039)	3 (0,020)	0,121	0,218
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	0,198	0 (0,000)	2 (0,013)	2 (0,013)	0 (0,000)	0,498	0,498

При цьому збіг розрахункових і фактичних даних для позитивних прогнозів склав 59,4 %; для негативних – 64,2 %. Правильність прогнозування для моделі в цілому склала 62,8 %. Негативний прогноз визначали такі комбінації генотипів *rs1799983* і *rs1800629*: *G/G+G/G*, *G/T+G/G*, *G/G+G/A*; позитивний – *T/T+G/G*, *G/T+G/A*, *G/G+A/A*, *T/T+G/A*, *G/T+A/A* і *T/T+A/A*. Комбінації генотипів де переважали протективні у відношенні розвитку ЦД2Т алелі (*G+G*), мали ймовірність позитивного прогнозу меншу за межову, а у комбінаціях з позитивним прогнозом – переважали алелі ризику (*T+A*).

6.2. Прогнозування тяжкості перебігу цукрового діабету 2-го типу

Як було відзначено, в якості залежної змінної для розробки математичної моделі прогнозування тяжкості перебігу ЦД2Т був використаний ІТХ, величина якого представлена співвідношенням суми ступенів тяжкості діабетичних ускладнень і віку пацієнта та виражена в умовних одиницях (див. формулу 2.1).

На користь інтегративного характеру запропонованого індексу свідчили результати серії однофакторних регресійних аналізів, проведених для оцінки зв'язку ІТХ з іншими клінічними показниками, які характеризували перебіг захворювання. Серед всіх клініко-лабораторних досліджень, що було проаналізовано у даному дослідженні три мали значущість для визначення ІТХ (табл. 6.13).

Таблиця 6.13

Коефіцієнти регресійних рівнянь та їх значущість для розрахунку ІТХ

Показник	$\beta \pm SE$	Wald	p
Тривалість хвороби	0,028 \pm 0,005	29,416	5,84E-08
Ступень тяжкості діабету	0,504 \pm 0,082	37,827	7,73E-10
Ступень компенсації за HbA1c	0,274 \pm 0,073	14,276	1,6E-04

Наведені дані підтвердили статистичну значущість зв'язку ІТХ з тривалістю хвороби ($p=5,84e-08$), ступенем тяжкості діабету ($p=7,73e-10$) та ступенем компенсації вуглеводного обміну за HbA1c ($p=1,6e-04$). Отже ІТХ був зв'язаний з прогресуванням захворювання і повною мірою міг характеризувати тяжкість перебігу ЦД2Т. Крім того, як показали попередні дослідження, у хворих 3-ї групи ІТХ був суттєво вищим за хворих 1-ї та 2-ї груп (див. табл. 3.1) – 8,96 ум.од. проти 5,13 ум.од. та 5,55 ум.од., відповідно ($p<0,001$). При цьому ІТХ був вищим за наявністю ризикових алелів вивчених поліморфізмів, наприклад, для поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* величина ІТХ склала 6,54 (3,77;9,09) за наявністю ризикового алеля *T* проти 5,77 (3,39;7,69) за наявністю алеля *G* ($p=0,018$). Алель ризику *A* поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* сприяв достеменно більшим величинам ІТХ (на 35,2%; $p<0,001$) у порівнянні з предковим алелем *C* (див. табл. 5.14).

Оскільки результати попередніх досліджень виявили вплив поліморфних генотипів генів (*NOS3*, *TNF α* , *EDNRA*, *EDNRB*) і чинників ендотеліальної дисфункції (ET1, NO x , eNOS, TNF α , ДК) на наявність діабетичних ускладнень при розробці математичної моделі для прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т були використані обидві групи показників. Використаний підхід дозволив об'єднати в одній моделі структурну сталість поліморфних генотипів з функціональною варіабельністю каскадів патологічних реакцій, що лежали в основі ЦД2Т і його ускладнень.

Розробку моделі провели з використанням багатофакторної лінійної регресії з використання обчислювальних середовищ GRM. Відбір статистично значущих незалежних змінних регресійних рівнянь здійснювали в режимі покрокового виключення.

Відповідність предикторів і залежних змінних категоріальним і індикаторним значенням, що було використано при розробці багатофакторних рівнянь логістичної і лінійної регресії, було наведено у табл. 2.4. В аналіз були включені всі хворі даного дослідження (152 особи).

Результати відбору предикторів на підставі їх статистичної значущості

наведені на рис. 6.1.

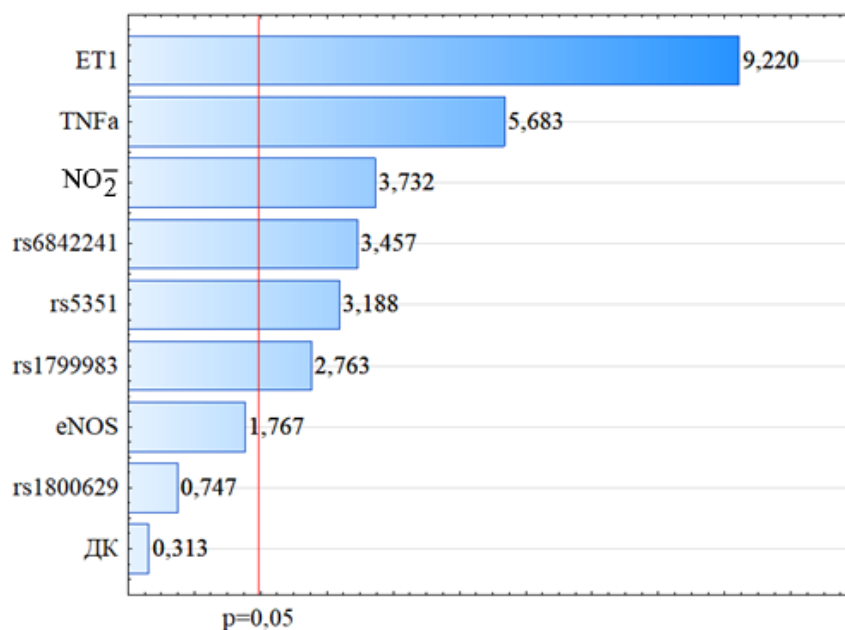


Рис. 6.1. Діаграма Pareto для незалежних змінних регресійного рівняння прогнозування тяжкості ЦД2Т за величиною ІТХ:

за горизонтальною віссю – значення t-коефіцієнта (Стюдента);
червоною лінією зображена межа значущості: $p=0,05$.

У зв'язку з тим, що три предиктори: eNOS, ДК і *rs1800629* значуще не відрізнялися від нульової гіпотези, вони були виключені з подальшої розробки. З тієї ж причини був відхилений вільний показник ($\beta_0 \pm SE$: $-25,690 \pm 42,827$; $t=0,360$; $p=0,548$). Показники, β -коефіцієнти яких задовольняли критеріям відбору та їх характеристики, наведені в табл. 6.14. Результати підтвердили статистичну значущість зв'язку відібраних незалежних змінних з розрахунковим показником – ІТХ ($p < 0,05$ для всіх предикторів).

Абсолютні величини коефіцієнтів регресії дозволили розташувати предиктори в ряд по спадаючій їх відносного вкладу в прогнозування підсумкової змінної регресійного рівняння:

$$ET1 > NO_x > EDRNB > EDNRA > NOS3 > TNF\alpha.$$

При цьому ET1, TNF α , NOS3, EDNRA демонстрували прямий, а NO $_x$ і EDNRB – зворотний зв'язок з ІТХ.

Таблиця 6.14

**Коефіцієнти регресійних рівнянь та їх значущість
для розрахунку ІТХ**

Показник	$\beta \pm SE$	Wald	p
ET1	3,989 \pm 0,402	98,567	0,0E-01
NO $_x$	-2,007 \pm 0,281	50,888	9,8E-13
TNF α	0,032 \pm 0,004	69,318	1,1E-16
NOS3	0,494 \pm 0,199	6,156	0,013
EDNRA	0,799 \pm 0,206	15,106	1,0E-04
EDNRB	-1,235 \pm 0,228	29,255	6,3E-08

Таким чином, формула для розрахунку ІТХ мала наступний вигляд:

$$ITX = 3,989 * ET1 - 2,007 * NO_x + 0,032 * TNF\alpha + 0,494 * NOS3 + 0,799 * EDNRA - 1,235 * EDNRB \quad (6.7),$$

де ET1 – вміст в крові ET1 в фмоль/мл;

NO $_x$ – вміст в крові стабільних метаболітів NO в мкмоль/л;

TNF α – вміст в крові TNF α в пг/мл;

NOS3 – індикаторне значення для генотипу *rs1799983*;

EDNRA – індикаторне значення для генотипу *rs6842241*;

EDNRB – індикаторне значення для генотипу *rs5351*.

Дослідження основних обчислювальних характеристик регресійного рівняння в цілому показало високий ступінь впливу предикторів на розрахунковий показник: коефіцієнт множинної кореляції $R=0,917$; коефіцієнт детермінації, що характеризував відповідність моделі фактичним даним $R^2=0,841$.

Аналіз різниць між фактичними і розрахунковими значеннями ІТХ

(табл. 6.15) показав відсутність суттєвих відмінностей ($p=0,655$).

З метою визначення інтервалів ІТХ, які могли би характеризувати менш або більш важкий перебіг ЦД2Т в залежності від поєднання генотипів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351* були проведені розрахунки ІТХ, результати яких представлені в таблиці 6.16. Розрахунок здійснювали за формулою 6.7. Як значення чинників ЕДФ для розрахунку ІТХ були використані величини медіан варіаційних рядів відповідних чинників.

Таблиця 6.15

Різниця між фактичними і розрахунковими значеннями ІТХ

Статистичні показники	Розрахункові	Фактичні
Me	6,171	6,170
Q1; Q3	4,095; 8,103	3,636; 8,333
Min; Max	0,312; 13,806	0,000; 16,279
p (W)	0,655	

У зв'язку з відсутністю статистичних відмінностей ІТХ у пацієнтів 1-ї і 2-ї груп (див. рис. 3.4; $p=0,348$) для подальшого аналізу ці групи були об'єднані в одну (група 1+2). Величини чинників, які були використані для розрахунків, відповідали значенням Me варіаційних рядів і були такими: для об'єднаної групи 1+2: ET1=2,22 фмоль/мл, NO=6,31 мкмоль/л, TNF α =97,72 пг/мл; для 3-ї групи: ET1=2,61 фмоль/мл, NO=6,06 мкмоль/л, TNF α =145,35 пг/мл.

При аналізі розрахунків було встановлено, що для хворих групи 1+2 перебіг захворювання характеризувався менш швидким прогресуванням значення ІТХ – Me=5,234 ум.од. (4,304; 6,164), при цьому 95% значень перебували в інтервалі $\pm 1,96\sigma$, що відповідало значенням ІТХ від 2,704 ум.од. до 7,764 ум.од.

Для хворих 3-ї групи перебіг захворювання характеризувався більш швидким прогресуванням, значення ІТХ склали – Me=8,816 ум.од. (7,886; 9,746). Інтервал ІТХ для 95% значень ($\pm 1,96\sigma$) склав від 6,286 ум.од. до 11,346 ум.од.

Інтервал значень ІТХ від 6,286 ум.од. до 7,764 ум.од. включав в себе значення показника з обох груп. Беручи до уваги наявність достеменної різниці між аналізованими групами ($p=5,6e-06$) межовим значенням в поділі груп був обраний середній показник ІТХ – $Me=7,025$ ум.од.

Таблиця 6.16

Залежність ІТХ від комбінацій генотипів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351*

NOS3	EDNRA	EDNRB	ІТХ, групи 1+2	ІТХ, група 3
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	2,706	6,288
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	3,200	6,782
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	3,505	7,087
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>T/T</i>	3,694	7,276
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	3,941	7,523
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	3,999	7,581
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>T/T</i>	4,304	7,886
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	4,435	8,017
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>T/T</i>	4,493	8,075
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	4,740	8,322
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>T/T</i>	4,798	8,380
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/T</i>	4,929	8,511
<i>G/G</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	5,176	8,758
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	5,234	8,816
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	<i>T/T</i>	5,292	8,874
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	5,539	9,121
<i>G/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	5,670	9,252
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/T</i>	5,728	9,310
<i>G/G</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	5,975	9,557
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	6,033	9,615
<i>T/T</i>	<i>C/C</i>	<i>C/C</i>	6,164	9,746
<i>G/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	6,469	10,051
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/T</i>	6,527	10,109
<i>G/G</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	6,774	10,356
<i>T/T</i>	<i>C/A</i>	<i>C/C</i>	6,963	10,545
<i>G/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	7,268	10,850
<i>T/T</i>	<i>A/A</i>	<i>C/C</i>	7,762	11,344
Me			5,234	8,816
Q1; Q3			4,304; 6,164	7,886; 9,746
p			5,6e-06	

Таким чином для менш швидкого (помірного) прогресування захворювання значення ІТХ знаходилися в інтервалі 2,704-7,025 ум.од., для більш швидкого прогресування захворювання – 7,026-11,346 ум.од. Очевидним слід вважати, що значення ІТХ менш 2,704 ум.од. відповідали повільному прогресуванню ЦД2Т.

Розподіл розрахованих значень ІТХ за зазначеними інтервалами відображено на рис. 6.2.

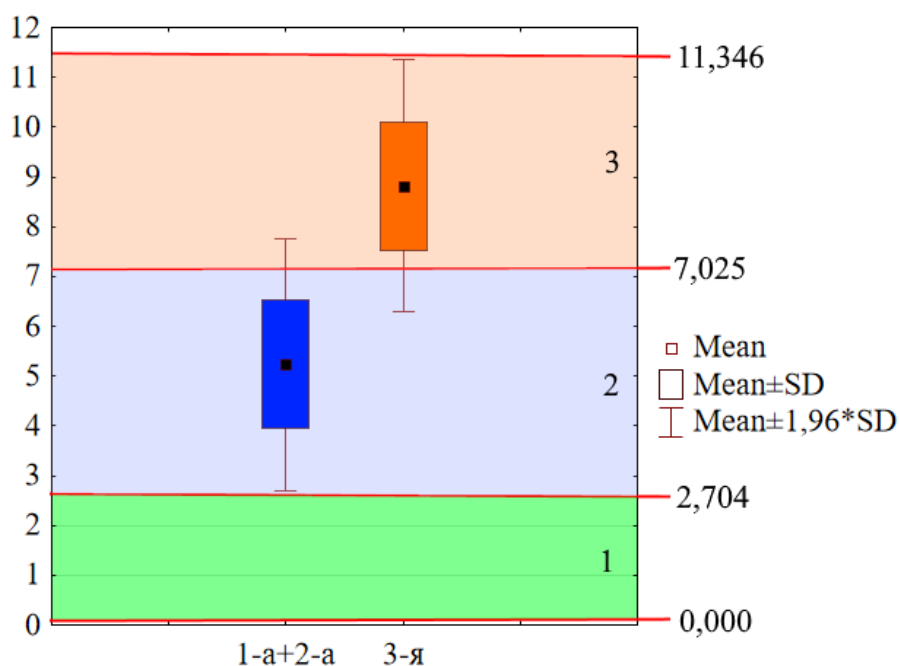


Рис. 6.2. Розподіл інтервалів значень ІТХ, що відповідали прогресуванню ЦД2Т:

1, 2 і 3 – інтервали значень повільного, помірного і швидкого прогресуванню захворювання;

за вертикальною віссю – ІТХ (ум.од.), за горизонтальною – групи

В таблиці 6.17 наведені результати аналізу розподілу частот поєднань генотипів *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351* в групах пацієнтів в залежності від тяжкості ЦД2Т. 1-а і 2-а групи, як і в таблиці 6.16, об'єднані в одну.

Поєднання генотипів *G/G+A/A+T/T*; *G/T+A/A+T/T*; *T/T+A/A+T/T*; *T/T+A/A+C/T* не зустрічалися в жодній з груп (в табл. 6.17 не наведені). По

іншим комбінаціям генотипів статистично значущих відмінностей між групами не виявлено. Отже, комбінації генотипів не визначали тяжкість ЦД2Т. Іншими словами, тяжкість захворювання не впливала на розподіл частот комбінацій досліджених генотипів.

Таблиця 6.17

Розподіл частот генотипів rs1799983, rs6842241 і rs5351 в залежності від тяжкості перебігу ЦД2Т

Генотипи	Група 1+2 (n=120)	3-я група (n=32)	p	ВШ	95% ВІ
G/G+C/C+T/T	3 (0,025)	0 (0,000)	1,000	0,00	0,00-N/A
G/T+C/C+T/T	3 (0,025)	0 (0,000)	1,000	0,00	0,00-N/A
G/G+C/A+T/T	1 (0,008)	0 (0,000)	1,000	0,00	0,00-N/A
T/T+C/C+T/T	1 (0,008)	0 (0,000)	1,000	0,00	0,00-N/A
G/G+C/C+C/T	6 (0,050)	3 (0,094)	0,398	1,97	0,46-8,33
G/T+C/A+T/T	3 (0,025)	0 (0,000)	1,000	0,00	0,00-N/A
G/T+C/C+C/T	14 (0,117)	4 (0,125)	1,000	1,08	0,33-3,54
T/T+C/A+T/T	0 (0,000)	1 (0,031)	1,000	max.	N/A-max.
G/G+C/A+C/T	5 (0,042)	1 (0,031)	1,000	0,74	0,08-6,59
T/T+C/C+C/T	9 (0,075)	1 (0,031)	0,689	0,40	0,05-3,26
G/G+C/C+C/C	13 (0,108)	3 (0,094)	1,000	0,85	0,23-3,19
G/T+C/A+C/T	7 (0,058)	2 (0,062)	1,000	1,08	0,21-5,45
G/G+A/A+C/T	3 (0,025)	1 (0,031)	1,000	1,26	0,13-12,52
G/T+C/C+C/C	14 (0,117)	4 (0,125)	1,000	1,08	0,33-3,54
T/T+C/A+C/T	4 (0,033)	2 (0,062)	0,607	1,93	0,34-11,06
G/G+C/A+C/C	8 (0,067)	1 (0,031)	0,685	0,45	0,05-3,75
G/T+A/A+C/T	5 (0,042)	1 (0,031)	1,000	0,74	0,08-6,59
T/T+C/C+C/C	4 (0,033)	2 (0,062)	0,607	1,93	0,34-11,06
G/T+C/A+C/C	5 (0,042)	3 (0,094)	0,366	2,38	0,54-10,54
G/G+A/A+C/C	1 (0,008)	2 (0,062)	0,112	7,93	0,7-90,44
T/T+C/A+C/C	4 (0,033)	1 (0,031)	1,000	0,94	0,1-8,67
G/T+A/A+C/C	3 (0,025)	0 (0,000)	1,000	0,00	0,00-N/A
T/T+A/A+C/C	4 (0,033)	0 (0,000)	0,579	0,00	0,00-N/A

У той же час, результати, що наведені вище (див. табл. 6.17),

підтвердили робочу гіпотезу про вплив генотипів на швидкість прогресування ускладнень діабету, інтегральним відображенням якої був ІТХ.

Резюме. Розраховані ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для всіх діабетичних ускладнень: ретинопатія визначалася генотипом *rs1800629* і *rs5351* ($\chi^2=13,50$; $p=0,001$), полінейропатія – генотипом *rs1799983* і *rs5351* ($\chi^2=20,19$; $p=4,14e-05$), діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації – *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351* ($\chi^2=53,55$; $p=0,0e-01$), діабетична нефропатія за рівнем альбумінурії і артеріальна гіпертензія – *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351* ($\chi^2=47,34$; $p=0,0e-01$ та $\chi^2=36,30$; $p=1,0e-07$, відповідно), макроангіопатія нижніх кінцівок – *rs1799983* і *rs1800629* ($\chi^2=8,50$; $p=0,014$). Правильність прогнозів була на рівні 62,8 % - 79,6 %. В цілому, комбінації генотипів, які містили ризикові алелі мали високу ймовірність розвитку ускладнення, тоді як комбінації з перевагою протективних алелей – ймовірність нижчу за межове значення. Розроблена математична модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за інтегративним показником індексу тяжкості хвороби (ІТХ), яка включала значущі показники комбінацій генотипів та чинників ЕДФ, які за питомим внеском розподілися таким чином: $ET1 > NOx > rs5351 > rs6842241 > rs1799983 > TNF$. При цьому $ET1$, $TNF\alpha$, *rs1799983*, *rs6842241* демонстрували прямий, а NOx і *rs5351* – зворотний зв'язок з ІТХ. Модель мала коефіцієнт множинної кореляції $R=0,917$, коефіцієнт детермінації $R^2=0,841$. Значення ІТХ менш 2,704 ум.од. відповідали повільному, від 2,704 ум.од. до 7,025 ум.од. – помірному та більші за 7,025 ум.од. – швидкому прогресуванню захворювання.

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступних публікацій [9, 13, 15, 18, 21, 23].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

ЦД – захворювання, яке проявляється в першу чергу за рахунок своїх ускладнень [41,152]. Аналіз розподілу пацієнтів по групах, що було здійснено за їх наявністю та вираженістю, показав, що за віком і статтю групи суттєво не відрізнялися (за виключенням 3-ї групи – де вік був вищим). Відповідно, й тривалість захворювання до часу включення пацієнтів до програми дослідження у хворих 3-ї групи була більшою. Цей факт, на наш погляд, свідчив про залежність проявів діабету від його тривалості – хворі 3-ї групи мали більший «стаж» захворювання.

Для об'єктивізації оцінки тяжкості перебігу захворювання нами був запропонований оригінальний індекс тяжкості хвороби – ІТХ. Величина цього індексу є відношенням сумарної ступені тяжкості діабетичних ускладнень, наявних у пацієнта, до його віку. Отже, ІТХ зворотно залежав від віку й прямо – від наявності та ступеню ускладнень. У хворих 1-ї та 2-ї груп ІТХ суттєво не відрізнявся, тоді як у хворих 3-ї групи був суттєво вищим (більш, ніж у три рази; $p < 0,001$).

Загалом, розподіл хворих по групах відповідав ступеню компенсації діабету за рівнем глікемії та HbA1c за класифікацією [37]. Ключова різниця для подальшої оцінки 1-ї і 2-ї груп полягала у ступені компенсації хворих з середнім ступенем тяжкості ЦД2Т: у 1-й групі хворі були компенсовані, тоді як у 2-й і 3-й групах – некомпенсовані.

У всіх хворих мала місце гіперінсулінемія та інсулінорезистентність, а у хворих 3-ї групи формувалася абсолютна інсулінова недостатність, що було підтверджено результатами визначення НОМА-ІР. Інсулярну недостатність у хворих 3-ї групи підтверджував і НОМА-ФБК, який був суттєво зниженим.

Рівні сечовини і креатиніну у крові по групах збільшувалися ($p < 0,001$), що відображало прогресування хронічної хвороби нирок [139]. Її розвиток також підтверджувало збільшення рівнів глюкози і альбумінурії.

ІМТ у хворих поступово збільшувався і максимального збільшення сягав у хворих 3-ї групи. Загальновідомий зв'язок ожиріння з ЦД2Т [40], ця закономірність показана і у нашому дослідженні, причому – саме для хворих 3-ї групи, тобто – за наявності декомпенсації та багатьох ускладнень. Крім того, за нашими результатами ожиріння у хворих на ЦД2Т можна зв'язати з високим рівнем у крові тригліцеридів. Також нами була показана важлива роль розвитку лептинорезистентності: рівень лептину поступово збільшувався по групах, сягаючи максимуму у 3-й групі. Отже встановлено, що при ЦД2Т розвивається феномен лептинорезистентності, при якому гіперлептинемія, що прямо залежить від об'єму жирової тканини, супроводжується втратою фізіологічних властивостей гормону та вносить істотний внесок у формування і прогресування ожиріння, ангіопатій та інсулінорезистентності.

Серед ускладнень найчастішою була сенсорна полінейропатія (88,1 % хворих). Також високою була розповсюдженість нефропатії (84,2 %) та ретинопатії (78,3 %). АГ була виявлена у 46,7 % хворих, а макроангіопатія нижніх кінцівок – у 21,0 %. По групах значуще відрізнялися частоти розподілу ретинопатії ($p=5,8e-04$), нефропатії за альбумінурією ($p=0,032$), макроангіопатії нижніх кінцівок ($p<0,001$) та артеріальної гіпертензії ($p=0,004$).

Рівень ET1 у групах хворих статистично значуще перевищував контроль (у 3,7-4,7 рази). З розвитком захворювання, в цілому, відмічена тенденція до більш високих значень ET1. Рівень NOx також збільшувався, але це не залежало від тяжкості захворювання. Наявність статистично значущої різниці між всіма групами підтвердило зв'язок між розвитком ЦД2Т і зниженням вмісту у крові eNOS, що можна розглядати як біомаркер окисного стресу [54]. Вміст у крові TNF α багаторазово перевищував контроль, особливо у 3-й групі, що показувало залежність активації цитокінового каскаду від тяжкості ЦД2Т, та узгоджувалося з літературними даними [59,148,217]. ДК накопичувалися у крові, що вказувало на активацію

окислення жирів.

Таким чином, були встановлені певні закономірності розвитку ЕДФ при збільшенні тяжкості ЦД2Т. Рівні у крові ET1, TNF α , NO x та ДК багаторазово достеменно збільшувалися, що, в цілому, відповідало ступеню тяжкості патологічного процесу, особливо для TNF α . Вміст у крові eNOS – знижувалися згідно до тяжкості патологічного процесу.

Побудова логістичних регресійних моделей прогнозування розвитку ускладнень показала, з одного боку, найбільш вагомі чинники для формування кожного з ускладнень, а, з іншого, – надала можливість для практичного розрахунку ймовірності розвитку ускладнень (рис. 7.1).



Рис. 7.1. Регресійні моделі прогнозу діабетичних ускладнень за чинниками ЕДФ.

Для наочності презентації маленькими колами зазначені чинники, що мають вплив на розвиток діабетичних ускладнень, колір яких відповідає кольору відповідних чинників ЕДФ у великих колах.

Ретинопатія і нефропатія за ШКФ визначалися вмістом у крові ET1 і TNF α ; полінейропатія – тільки рівнем ендотеліну-1; нефропатія за рівнем альбумінурії – рівнями ET1, eNOS і ДК; артеріальна гіпертензія – рівнями ET1, NOx і TNF α ; ангіопатія ніжних кінцівок – рівнями NOx і TNF α . Ці факти вказували на можливість прогнозування ускладнень у кожному конкретному випадку виходячи з рівнів у крові чинників ЕДФ. На наш погляд, такий підхід і є найбільш оптимальним з позицій концепції індивідуалізованої медицини.

Методичною основою для цього може бути регресійний аналіз. Регресійні рівняння прогнозування розвитку ускладнень мали задовільні характеристики правильності прогнозу, що підтверджувало патогенетичне значення чинників ЕДФ для розвитку відповідних ускладнень. Всі моделі мали високий рівень прогностичної точності (60,5% - 90,8%).

З іншого боку, однофакторний регресійний аналіз показав, що ET1 обумовлював високу глікемію, альбумінурію, підвищував ступінь декомпенсації ЦД2Т і ступінь діабетичної нефропатії. Накопичення у крові NOx впливало на зниження швидкості клубочкової фільтрації та погіршення функції нирок. TNF α і ДК комплексно впливали на майже всі ключові показники ЦД2Т, що мало синергічну дію з іншими чинниками ЕДФ.

ET1 прямо впливав на розвиток всіх ускладнень ЦД2Т (крім макроангіопатії ніжних кінцівок); TNF α мав вплив на розвиток ретинопатії, нефропатії за ШКФ і артеріальної гіпертензії; накопичення у крові NO сприяло розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок. Кількісні критерії сумовані на рис. 7.2.

Вміст ET1 вищий за 1,990 фмоль/мл підтверджував розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, а вище за 2,309 фмоль/мл – інших ускладнень. Збільшення вмісту у крові TNF α вище за 102,0 пг/мл і 105,1 пг/мл характеризувало розвиток ретинопатії та нефропатії, відповідно. Розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, крім ET1, підтверджувало

зменшення вмісту у крові eNOS нижче за 250,4 пг/мл та ДК нижче за 5,368 Од/мл. Для всіх чинників встановлені критичні рівні розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок та майже для всіх (крім eNOS) – на розвиток артеріальної гіпертензії.

	ET1	NO _x	eNOS	TNFα	ДК
Ретинопатія	>2,404			>102,4	
Полінейропатія	>2,447	<6,298	<218,4	>114,5	<5,194
Нефропатія (ШКФ)	>2,309				
Нефропатія (МАУ)	>2,253			>105,1	
Артеріальна гіпертензія	>1,990		<250,4		<5,368
Ангіопатія Н/К	>2,311	<6,290		>102,0	<5,328

Рис. 7.2. Критичні значення чинників ЕДФ, які асоційовані з наявністю діабетичних ускладнень.

Одиниці вимірювання: ET1 – фмоль/л; NO_x – мкмоль/л; eNOS – пг/мл; TNFα – пг/мл; у всіх випадках порівнянь $p < 0,05$

Численні роботи вказують на важливу роль генних варіантів поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* на розвиток та прогресування ЦД2Т [52,68,92,131,153,207,223]. Отже цей поліморфізм має відношення до розвитку ускладнень ЦД2Т, що продиктувало необхідність окремого дослідження ролі цього поліморфізму у формуванні ЕДФ при ЦД2Т.

Ще у мета-аналізі Z. H. Liu (2013) у китайського населення популяції

Хан, до якого увійшло 10 досліджень (1425 хворих на ЦД2Т та 1116 контролів), було встановлено наявність зв'язку алеля *A* поліморфізму *rs1800629* гена *TNF α* з ризиком ЦД2Т.

ЕДФ та система ET1 і його рецепторів приймає активну участь у розвитку діабетичних судинних ускладнень [156]. При ЦД2Т підвищена експресія ET1 і ETa, що відповідало ступеню нефропатії [160] і ретинопатії [64].

Як встановлено у нашому дослідженні у пацієнтів, які належать до українській популяції наявність в генотипі мінорного алеля *T rs1799983* гена *NOS3*; мінорного алеля *A rs1800629* гена *TNF α* ; мінорного алеля *A rs6842241* гена *EDNRA* і предкового алеля *C rs5351* гена *EDNRB* асоційовано з клініко-лабораторними показниками та розвитком ускладнень у хворих на ЦД2Т: наведені алелі ризику погіршували тяжкість хвороби та сприяли прогресуванню ЕДФ.

Для мінорного генотипу поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* (*T/T*) при прогресуванні захворювання був показаний достеменний вплив на зростання ІТХ і альбумінурії та – зниження швидкості клубочкової фільтрації. Мінорний генотип поліморфізму *rs6842241* гена *EDNRA* (*A/A*) обумовлював більші величини ІМТ, артеріального тиску, ІТХ, ліпопротеїнів низької щільності та лептину.

Мінорний генотип поліморфізму *rs5351* гена *EDNRB* (*T/T*) обумовлював меншу тривалість захворювання, ІТХ, креатиніну та альбумінурії і більшу величину швидкості клубочкової фільтрації, що вказувало на його протективний вплив за умов ЦД2Т. Для мінорного алеля *T rs1799983* гена *NOS3* був показаний достеменний вплив на зростання ІТХ та альбумінурії та – зниження швидкості клубочкової фільтрації. Мінорний алель *A rs6842241* гена *EDNRA* обумовлював більші величини ІМТ, артеріального тиску, ІТХ і Тригліцеридів.

Мінорний алель *T rs5351* гена *EDNRB* обумовлював меншу ТЗ,

величини ІТХ, сечовини, креатиніну та альбумінурії і більшу швидкість клубочкової фільтрації, що підтверджувало протективний ефект саме цієї алелі. Такі дані з іншого боку підтвердили наявність достеменного впливу генетичних поліморфізмів на тяжкість перебігу ЦД2Т.

У дослідженнях [119,223] було доведено зв'язок поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* з розвитком діабетичної нефропатії. При цьому, поліморфізм *rs1799983* не впливав на активність NO у судинах нирки при діабетичній нефропатії, але алель *T* був пов'язаний з підвищенням окисного стресу у таких випадках [229].

На значущий зв'язок поліморфізму *rs1799983* гена *NOS3* з розвитком діабетичної нефропатії вказувало також дослідження, що було проведено у Північному Китаї (431 хворий на ЦД2Т з діабетичною нефропатією проти 420 хворих на ЦД2Т без неї) [119].

Виявленню зв'язку поліморфізмів генів прозапальних цитокінів (*TNFα*, *IL-6* і *IL-1β*) з ЦД2Т і діабетичною нефропатією присвячено нещодавнє комплексне індійське дослідження [113]. Поліморфізм *rs1800629* гена *TNFα* було визначено у 1326 пацієнтів, серед яких було 448 особи з ЦД2Т та діабетичною нефропатією, 414 осіб з ЦД2Т без діабетичної нефропатії та 464 контролів. Найвищу асоціацію з ЦД2Т за наявності діабетичної нефропатії мав поліморфізм *rs1800629* гена *TNFα*: для генотипу *A/A* ВШ=2,75 (95% ВІ 1,64-4,59; $p=0,001$). Також у дослідженні [231] встановлено, що мінорний генотип *A/A* і алель *A* *rs1800629* значно підвищували рівні у крові *TNFα*, що було виражено більшою мірою у хворих з нефропатією.

Отже, ці літературні дані, поряд із отриманими у даному дослідженні, встановлювали загальну патогенетичну закономірність: наявність мінорного алеля *A* є патогенетичним фактором розвитку діабетичної нефропатії, а одним з механізмів розвитку цього стану може бути надлишкова експресія гену *TNFα*, що призведе до надмірного синтезу прозапального цитокіну *TNFα*. Більший вміст у таких хворих ET1 і стабільних метаболітів NO

вказував на залучення і цих чинників ЕДФ у патогенез діабетичної нефропатії, можливо, внаслідок більшого пошкодження ендотелію у хворих-носіїв алеля *A*.

Дослідження [47,156] переконливо показали, що ЕДФ та система ET1 і його рецепторів приймає активну участь у розвитку діабетичних судинних ускладнень. Так, при ЦД2Т визначена підвищена експресія ET1 і рецепторів EDNRA, що відповідало ступеню нефропатії [160].

За сучасними уявленнями патогенез діабетичної нефропатії це складний багатовимірний процес в якому поєднується запалення, окисний стрес та генетичні чинники [142,248]. Ключова роль належить гломерулярній гіперфільтрації внаслідок порушення тубуло-гломерулярного зворотного зв'язку, що зменшує тонус аферентної артеріоли і призведе до гломерулярної гіпертензії. Вочевидь, що результати даного дослідження обґрунтовують залучення до цих механізмів і виявлені патогенетичні закономірності.

Дослідження здійснені словенськими вченими довели наявність зв'язку поліморфізмів гена *EDNRB* з розвитком діабетичної ретинопатії [64]. Іспанські дослідники [169] встановили, що деякі поліморфізми в системі генів ендотелінових рецепторів можуть бути пов'язані з діабетом та ожирінням.

Користуючись літературними даними, а також власними результатами, були розраховані математичні моделі розвитку та межові значення позитивного прогнозу для всіх згаданих у роботі діабетичних ускладнень. Узагальнена інформація наведена на рис. 7.3.

Ретинопатія визначалася генотипом *rs1800629* і *rs5351* ($\chi^2=13,50$; $p=0,001$), полінейропатія – генотипом *rs1799983* і *rs5351* ($\chi^2=20,19$; $p=4,14e-05$), діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації – *rs1799983*, *rs1800629* і *rs5351* ($\chi^2=53,55$; $p=0,0e-01$), діабетична нефропатія за альбумінурією і артеріальна гіпертензія – *rs1799983*, *rs6842241* і *rs5351* ($\chi^2=47,34$; $p=0,0e-01$ та $\chi^2=36,30$; $p=1,0e-07$, відповідно), макроангіопатія

нижніх кінцівок – *rs1799983* і *rs1800629* ($\chi^2=8,50$; $p=0,014$). Правильність прогнозів була на рівні 62,8 % - 79,6 %.

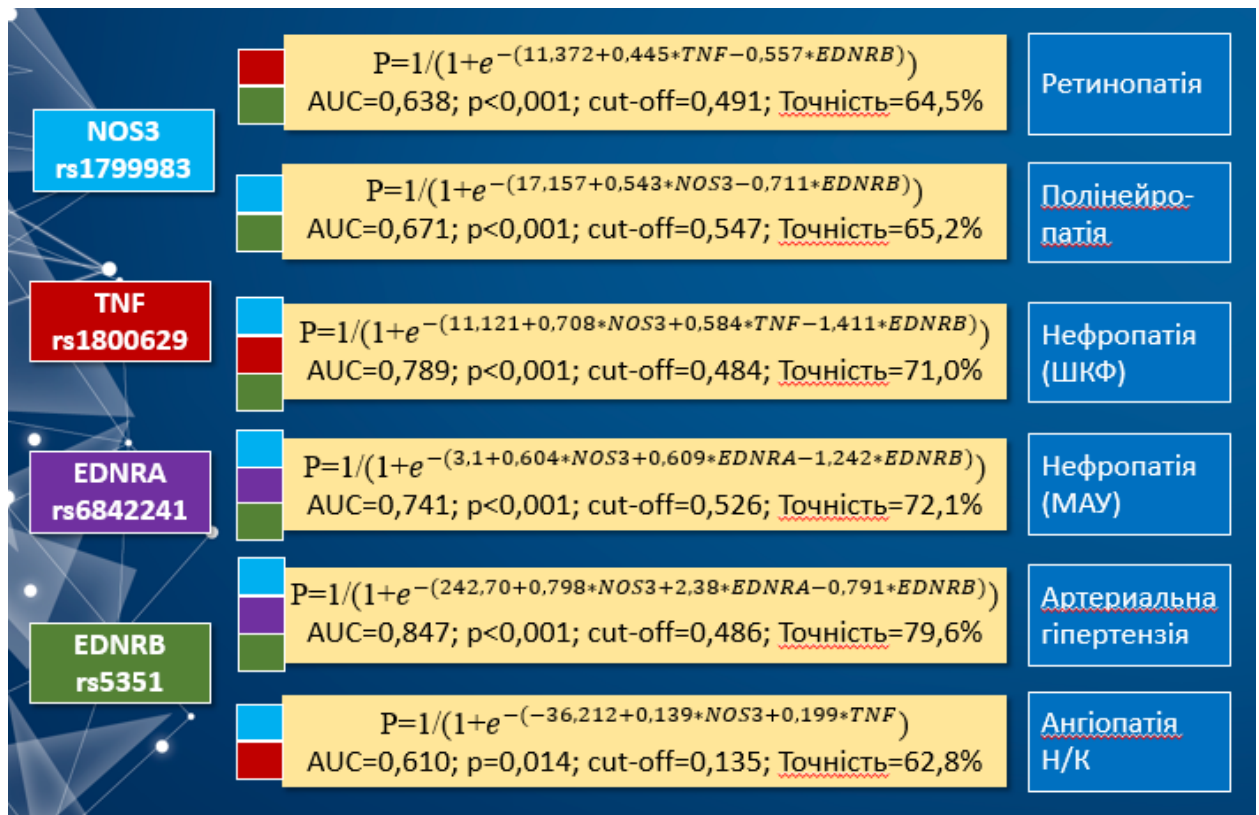


Рис. 7.3. Регресійні моделі прогнозу діабетичних ускладнень за поліморфізмами генів *NOS3*, *TNF α* , *EDNRA* і *EDNRB*.

Для наочності презентації маленькими прямокутниками зазначені поліморфізми, що мали вплив на розвиток діабетичних ускладнень, колір яких відповідає кольору генетичних поліморфізм у великих прямокутниках.

В цілому, комбінації генотипів, які містили ризикові алелі мали високу ймовірність розвитку ускладнення, тоді як комбінації з перевагою протективних алелей – ймовірність нижчу за межеве значення.

Розроблена математична модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за інтегративним показником ІТХ (рис. 7.4).

Модель включала значущі чинники ЕДФ та комбінацій генотипів, які за питомим внеском розподілися таким чином:

$$ET1 > NOx > rs5351 > rs6842241 > rs1799983 > TNF.$$

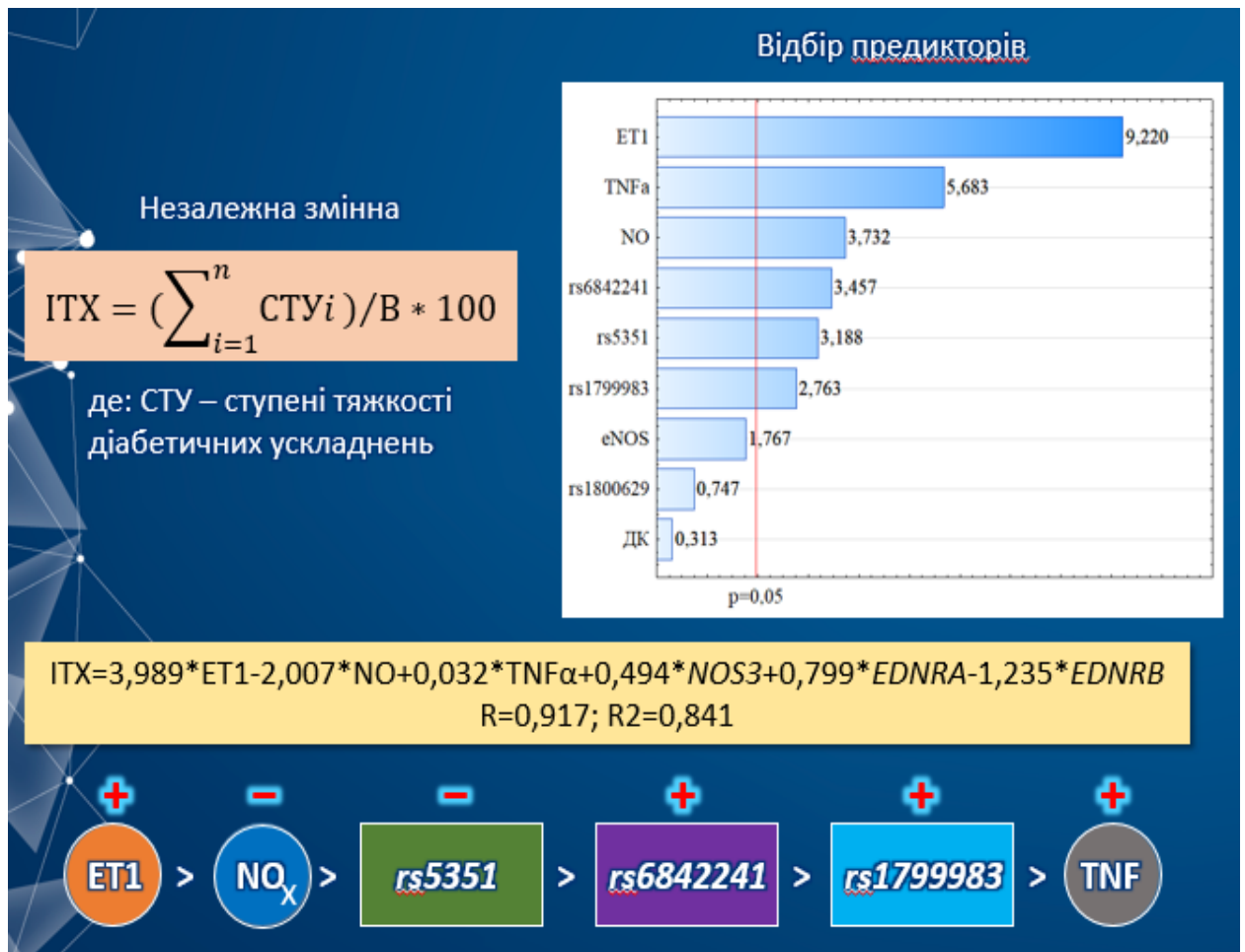


Рис. 7.4. Регресійна модель прогнозу тяжкості діабету

При цьому ET1, TNFα, *rs1799983*, *rs6842241* демонстрували прямий, а NO_x і *rs5351* – зворотний зв'язок з ITX. Значення ITX менш 2,704 ум.од. відповідали повільному, від 2,704 ум.од. до 7,025 ум.од. – помірному та більші за 7,025 ум.од. – швидкому прогресуванню захворювання (F=48,50; p<0,001).

Проведене дослідження дозволило виділити чотири гена, для поліморфізмів яких було встановлено асоціативний зв'язок з ЕДФ (рис. 7.5): наявність в генотипі мінорних алелей генів *NOS3* і *EDNRB* пригнічували активність eNOS і ETb, відповідно; наявність в генотипі мінорних алелей генів *TNFα* і *EDNRA* експресувало синтез TNFα і ETa. Отже, патогенетичні ефекти вивчених поліморфізмів мали односпрямовану дію і ті самі мішені, що й ключові ланки патогенезу ЕДФ.

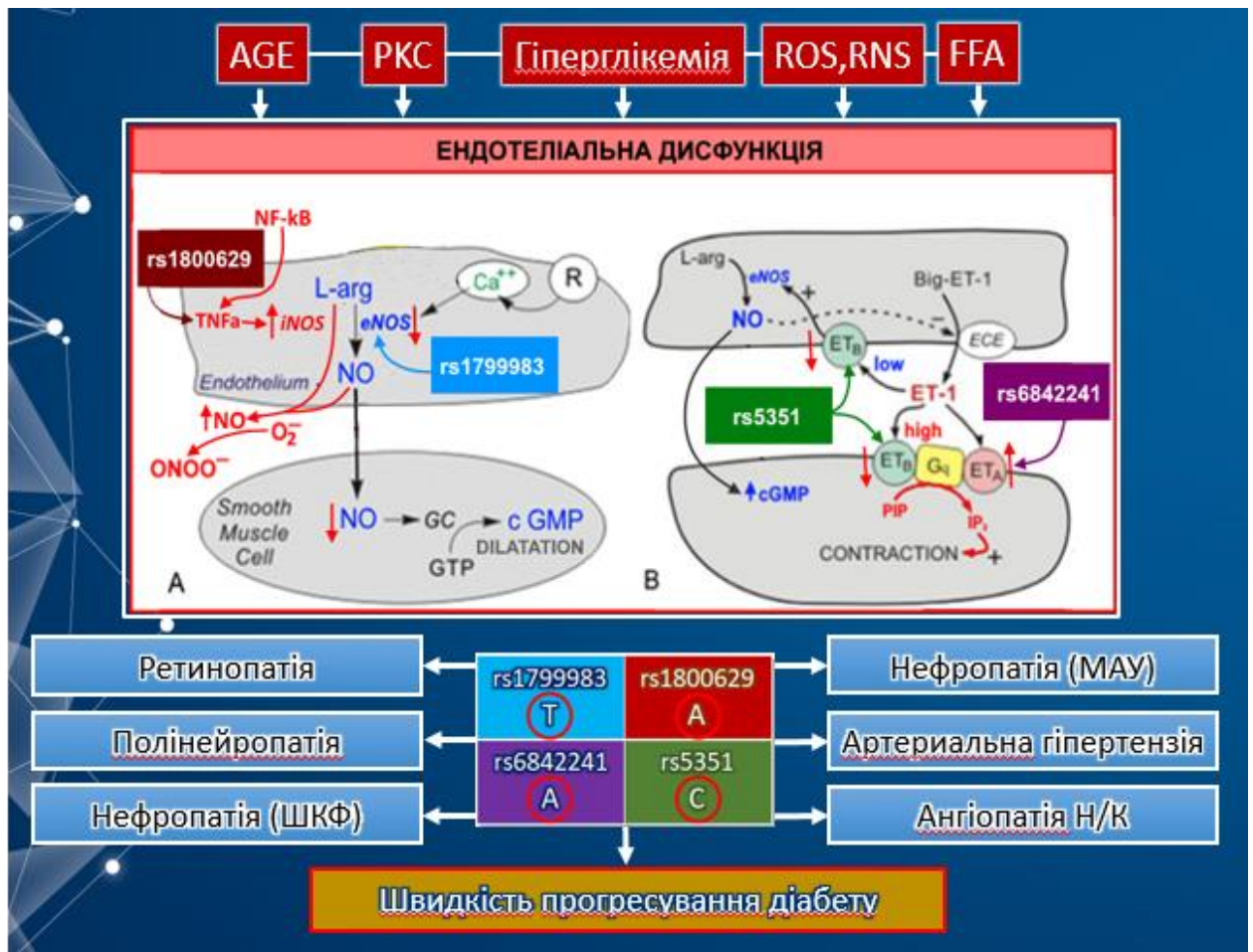


Рис. 7.5. Роль генетичних поліморфізмів в патогенезі ЕДФ при ЦД2Т

Таким чином, переважання алелей ризику вивчених поліморфізмів в генотипі пацієнтів здатні змінювати реактивність системи регуляції ендотеліальної функції та робили її більш уразливою до патогенного впливу ушкоджуючих чинників діабету. В ході виконаної роботи було встановлено, що генотип пацієнтів визначав характер діабетичних ускладнень і швидкість їх прогресування, що й обумовлювало тяжкість перебігу захворювання.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення результатів і досягнуто сучасне рішення актуального наукового завдання – на підставі клінічних, лабораторних та математичних методів дослідження визначено роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції та розроблені моделі прогнозування розвитку судинних ускладнень при цукровому діабеті 2 типу.

1. У всіх обстежених хворих наявна гіперглікемія з перевищенням вмісту у крові глюкози у 2,4-3,3 рази ($p < 0,001$) і HbA1c 1,5-2,0 рази ($p < 0,001$) в порівнянні з контролем. Рівень вуглеводного обміну у 1-й групі пацієнтів був компенсований, у 2-й і 3-й групах – некомпенсований. Для хворих 1-ї і 2-ї груп властива гіперінсулінемія, 3-ї групи – гіпоінсулінемія із зниженням функції бета-клітин підшлункової залози. Пацієнти 3-ї групи були в середньому на 6 років старшими та довше (на 8,5 років) хворіли ($p < 0,001$), мали зайву вагу або ожиріння (ІМТ від 28,4 кг/м² до 35,0 кг/м²) на тлі гіпертригліцеридемії. У хворих всіх груп спостерігалась інсулінорезистентність, лептинорезистентність і гіперлептинемія.

2. Серед діабетичних ускладнень найчастіше діагностувалась сенсорна полінейропатія (88,1 %), нефропатія (84,2 %), ретинопатія (78,3 %) та артеріальна гіпертензія (46,7 %). По групах значуще збільшувалась частота та ступені ретинопатії ($p < 0,001$), нефропатії за альбумінурією ($p = 0,032$), макроангіопатії ніжних кінцівок та артеріальної гіпертензії ($p < 0,001$). Запропонований індекс тяжкості хвороби - ІТХ, величина якого відображає тяжкість перебігу захворювання – прямо залежить від кількості та тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта.

3. Вміст у крові ET1 і NOx у хворих перевищують контроль у 3,7-4,7 рази ($p < 0,001$) і 1,4-1,5 рази ($p < 0,001$), відповідно. Найбільшого приросту сягають рівні TNF α (у 4,2-6,5 рази; $p < 0,001$) і ДК (у 2,3-2,7 рази; $p < 0,001$). Вміст eNOS у крові в групах хворих є нижчим за контроль (у 1,3-1,9;

$p < 0,001$). Результати регресійного аналізу свідчать, що ET1 обумовлює високу глікемію, альбумінурію, підвищує ступені декомпенсації діабету і нефропатії. Накопичення у крові NOx впливає на зниження швидкості клубочкової фільтрації та погіршення функції нирок. Рівні TNF α і ДК є факторами, котрі комплексно впливають на всі ключові показники ЦД2Т. Чинники ендотеліальної дисфункції визначають розвиток діабетичних ускладнень: ET1 прямо впливає на розвиток всіх ускладнень (крім макроангіопатії нижніх кінцівок); TNF α визначає розвиток ретинопатії, нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації і артеріальної гіпертензії; накопичення у крові NOx сприяє розвитку макроангіопатії нижніх кінцівок.

4. Розподіл алелей *rs1799983* гена *NOS3* асоційований з розвитком ЦД2Т ($\chi^2=5,82$; $p=0,016$). Наявність у генотипі мінорного алеля *T* збільшує у 1,6 рази шанси розвитку захворювання (ВШ=1,59; 95% ВІ 1,09-2,32), сприяє декомпенсації діабету за рівнем HbA1c та погіршенню функції нирок (згідно з вмістом у крові креатиніну, альбумінурією та клубочковою фільтрацією) і корелює з меншим вмістом у крові NOx ($p < 0,001$) та eNOS ($p < 0,001$). Алель *T* впливає на наявність нефропатії та артеріальної гіпертензії.

5. Розподіл алелей *rs1800629* гена *TNF α* асоційований з розвитком ЦД2Т ($\chi^2=5,91$; $p=0,015$). Наявність у генотипі мінорного алеля *A* збільшує у 1,7 рази шанси розвитку захворювання (ВШ=1,71; 95% ВІ 1,11-2,65), сприяє зменшенню клубочкової фільтрації і розвитку нефропатії та обумовлює розвиток ендотеліальної дисфункції з високими рівнями у крові TNF α ($p < 0,001$), ET1 ($p=0,026$) і NOx ($p < 0,001$).

6. Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів впливають на розвиток ЦД2Т: для *rs6842241* гена *EDNRA* підвищення ризику (ВШ=1,87; 95% ВІ 1,20-2,92) асоційовано з мінорним алелем *A* ($\chi^2=5,91$; $p=0,005$); для *rs5351* гена *EDNRB* (ВШ=1,54; 95% ВІ 1,05-2,25) – з предковим алелем *C* ($\chi^2=4,94$; $p=0,026$). Наявність цих алелей сприяє достеменно вищому рівню ET1 у крові ($p < 0,001$). Поліморфізми генів ендотелінових рецепторів мають значення: *rs6842241* для розвитку артеріальної гіпертензії; *rs5351* – сенсорної

полінейропатії і нефропатії. Алель *A rs6842241* сприяє вищим значенням ІМТ, систолічного і діастолічного артеріального тисків, ІТХ та рівню у крові тригліцеридів у порівнянні з алелем *C*. Алель ризику *C rs5351* в генотипі хворих підвищує тривалість захворювання, показник ІТХ, рівні сечовини і креатиніну у крові, альбумінурію та зменшую швидкість клубочкової фільтрації у порівнянні з наявністю алеля *T*.

7. Розраховано ймовірності розвитку та межові значення позитивного прогнозу для всіх ускладнень ЦД2Т. Точність прогнозів складає 62,8 %-79,6 %. Розроблено математичну модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т за індексом тяжкості хвороби, яка включає значущі комбінації генотипів та чинники ендотеліальної дисфункції, які за питомим внеском розподіляються наступним чином: $ET1 > NOx > rs5351 > rs6842241 > rs1799983 > TNF\alpha$ ($F=48,50$; $p<0,001$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Запропоновано індекс тяжкості хвороби, величина якого відображала тяжкість перебігу ЦД2Т: прямо залежала від кількості та ступенів тяжкості ускладнень і зворотно – від віку пацієнта. На його підставі розроблено математичну модель прогнозу тяжкості перебігу ЦД2Т, яка включала значущі комбінації генотипів та маркери ЕДФ. За питомим внеском ці фактори розподілись таким чином: $ET1 > NOx > rs5351 > rs6842241 > rs1799983 > TNF\alpha$. Прогресування діабету, розраховане за прогнозом, розцінюється як повільне при ІТХ менше за 2,7 ум.од., помірне – 2,7-7,0 ум.од. і швидке – 7,1-11,3 ум.од.

2. Побудовано багатофакторні регресійні моделі для прогнозування ймовірності розвитку діабетичних ускладнень за генотипом: ретинопатія визначалась генотипом $rs1800629$ і $rs5351$, полінейропатія – $rs1799983$ і $rs5351$, діабетична нефропатія за швидкістю клубочкової фільтрації – $rs1799983$, $rs1800629$ і $rs5351$, діабетична нефропатія за рівнем альбумінурії і артеріальна гіпертензія – $rs1799983$, $rs6842241$ і $rs5351$, макроангіопатія нижніх кінцівок – $rs1799983$ і $rs1800629$.

3. Побудовано моделі прогнозування розвитку ускладнень в залежності від вмісту маркерів ЕДФ в крові: для ретинопатії мали значення рівні $ET1$ і $TNF\alpha$; для макроангіопатії нижніх кінцівок – NOx і $TNF\alpha$; для полінейропатії – $ET1$; для нефропатії за швидкістю клубочкової фільтрації – $ET1$ і $TNF\alpha$; для нефропатії за альбумінурією – $ET1$ і $eNOS$; для артеріальної гіпертензії – $ET1$, NOx і $TNF\alpha$.

4. Розраховано критичні рівні у крові маркерів ЕДФ: вміст $ET1$ вищий за 1,990 фмоль/мл підтверджував розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, а вище за 2,309 фмоль/мл – інших ускладнень. Збільшення вмісту у крові $TNF\alpha$ вище за 102,0 пг/мл і 105,1 пг/мл характеризувало розвиток ретинопатії та нефропатії, відповідно. Розвиток нефропатії за рівнем альбумінурії, крім $ET1$, підтверджувало зменшення вмісту у крові $eNOS$ нижче за 250,4 пг/мл та ДК нижче за 5,368 Од./мл.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Беловол АН, Князькова ИИ. Сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет. *Здоровье Украины*. 2014; 27(3): 28-9.
2. Власенко МВ. Ускладнення цукрового діабету – діабетична дистальна полінейропатія: патофізіологія і варіант патогенетичного лікування. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2011;7(39): 44-9.
3. Гаврилов ВБ, Мишкорудная МИ. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лабораторное дело*. 1983;3: 33-6.
4. Голиков ПП, Николаева НЮ, Марченко ВВ, Матвеев СБ, Голиков АП, Давыдов БВ, и др. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях. *Пат. физиол. exper. терапия*. 2000; 2: 6-9.
5. Горобейко МБ. Синдром діабетичної стопи. Надумана чи реальна загроза. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2017; 1(57): 81-9.
6. Дегтярь НИ, Герасименко НД, Расин МС. Эндотелий и системное воспаление: роль ядерных транскрипционных факторов и терапевтические возможности (обзор литературы). *Артер. гипертензия*. 2016; 4: 21-5.
7. Дріянська ВС, Драннік ГМ, Маріненко МІ, Савченко ВС, Дудар ІО, Величко МБ, та ін. Фактори міжклітинної кооперації імунної системи (цитокіни та VCAM-1) у хворих на хронічну хворобу нирок I-III стадій, діабетичну нефропатію. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2010; (1): 95-9.
8. Зак КП, Тронько НД, Попова ВВ, Бутенко АК. Сахарный диабет. Иммуитет. Цитокины. Киев: Книга-плюс; 2015. 485 с.
9. Зяблицев СВ, Чернобrivцев ОП, Зяблицев ДС, Стародубська ОО. Патогенетична роль ендотеліну-1 та поліморфізму його рецепторів при цукровому діабеті 2 типу. *Фізіол. журн*. 2019; 65(2):22-30.
10. Зяблицев СВ, Ларін ОС, Новосельська ВВ, Дашук ТІ, Гаврюшенко ЛВ, Чернобrivцев ОП. Управління технологічними процесами та критерії їх

оцінки на етапах виконання лабораторних досліджень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2015;1(49): 55-61.

11. Зябліцев СВ, Могилевський СЮ, Бушуева ОВ, Черnobривцев ОП. Можлива роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 при діабетичній ретинопатії і цукровому діабеті 2 типу. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2017; 2(58): 34-8.

12. Зябліцев СВ, Панова ТІ, Черnobривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медицина України*. 2018;1-2:34-39.

13. Зябліцев СВ, Черnobривцев ОП, Борис РМ. Поліморфізм генів, що мають відношення до розвитку ендотеліальної дисфункції, при цукровому діабеті 2 типу. Тези доп. VII нац. конгресу патофізіологів України з міжнародною участю. Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції; 2016 жовт. 5-7; Харків. Харків: Вид-во НФаУ; 2016. с. 92.

14. Зябліцев СВ, Черnobривцев ОП, Гришов АА, Паламар С. Поліморфізм генів проліфератора пероксисом гамма 2 типу (PPARG) та рецептора лептину (LEPR) обумовлюють розвиток цукрового діабету 2 типу. В : Бюлетень мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцького; 2018 трав. 24-25; Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту; 2018. с. 93-94.

15. Зябліцев СВ, Черnobривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018; 4(64): 35-44.

16. Зябліцев СВ, Черnobривцев ОП, Зябліцев ДС. Значення фактору некрозу пухлин альфа у механізмах розвитку нефропатії при цукровому діабеті 2 типу. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2019; 65(1):72-80.

17. Зябліцев СВ, Черnobривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический*

журнал. 2018;14(7):661-7.

18. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Поліморфізм rs1800629 гена TNF α при цукровому діабеті 2 типу. зв'язок з розвитком нефропатії. *Международный эндокринологический журнал. 2019;15(1):24-30.*

19. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцева МВ. Структура ускладнень цукрового діабету 2 типу у залежності від його тяжкості. *Актуальні проблеми транспортної медицини. 2019;55(1):130-7.*

20. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Піщуліна МІ. Варіабельність генів VEGF, NOS3, II-1b та TNF α при цукровому діабеті 2 типу. В: Бюлетень матеріалів наук. конф. XVI читання ім. В.В. Подвисоцького, 2017 трав.18-19; Одеса. Одеса : УкрНДІ медицини транспорту; 2017. с. 137-138.

21. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП. Вплив поліморфізмів rs1799983 гена NOS3 та rs1800629 гена TNF α на розвиток ендотеліальної дисфункції у хворих на цукровий діабет 2 типу. В: Тези VII Пленуму Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практична конференція. Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики, присвячені 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка; 2018 жовт. 10-12 ; Полтава. Полтава; 2015, с. 32-33.

22. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП. Значення ендотеліну-1 у розвитку інсулінорезистентності і ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. В: Бюлетень мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцького; 2018 трав. 24-25; Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту; 2018. с. 97-98.

23. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП. Роль поліморфізму rs1799983 гена NOS3 у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. *Клінічна та експериментальна патологія. 2017; 3(61): 44.*

24. Зябліцев СВ, Чернобривцев ПА, Чернобривцев ОП, Антонов ЄВ. Вплив поліморфізму rs1137101 гена рецептора лептину на розвиток цукрового діабету 2-го типу. *Експериментальна і клінічна медицина. 2016; 2*

(71): 86-90.

25. Камінський ОВ. Офіційні критерії діагностики цукрового діабету, нормоглікемія і самоконтроль глікемії. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2017; 13(3): 184-190. DOI: 10.22141/2224-0721.13.3.2017.104117.

26. Кізуб ІВ, Клименко КІ, Соловйов АІ. Участь протеїнкінази С (ПКС) у механізмах порушення судинного тону́су за умов цукрового діабету. Ч. 3 : (огляд). *Фармакологія та лікар. Токсикологія*. 2015; 3: 3-9.

27. Кізуб ІВ, Клименко КІ, Соловйов АІ. Участь протеїнкінази С у механізмах порушення судинного тону́су за умов цукрового діабету. Ч. 1. *Фармакологія та лікар. токсикологія*. 2014; 1: 10-6.

28. Кізуб ІВ, Клименко КІ, Соловйов АІ. Участь протеїнкінази С у механізмах порушення судинного тону́су за умов цукрового діабету. Ч. 2. *Фармакологія та лікар. токсикологія*. 2014; 2: 12-7.

29. Кузнецова АС, Гоженко АІ, Кузнецова ЕС, Шухтин ВВ, Кузнецова ЕН, Кузнецов СГ. *Эндотелий. Физиология и патология : монография*. Одесса : Фенікс; 2018. 284 с.

30. Луценко ЛА. Роль гликированного гемоглобина в диагностике и мониторинге сахарного диабета. *Сімейна медицина*. 2014; 5: 105-8.

31. Маньковский БН. *Диабетическая полинейропатия — эпидемиология, патогенез, клинические проявления, диагностика и лечение*. В: Караченцева ЮИ, Казакова АВ, Кравчун НА, Ильиной ИМ., ред. 100 избранных лекций по эндокринологии (второй выпуск). Харьков: С.А.М.; 2014. с. 164-71.

32. Маньковский БН. Распространенность невыявленного сахарного диабета 2 типа и предиабета в Украине: результаты эпидемиологического исследования «ДИАПАЗОН». *Диабет, ожирение, метаболический синдром*. 2014; 5 (III): 70-5.

33. Маньковський БН, Могильницька ЛА, Могильницька ОЄ. Вміст адгезійних молекул, Е-селектину та ендотелійзалежна дилатація у хворих на цукровий діабет 1-го типу з мікроангіопатіями, які хворіють із дитинства, та

в осіб молодого віку з ожирінням. Ендокринологія [Інтернет]. 2015 [цитовано 21.03.2019]; 20(4): 696-700. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/enkrl_2015_20_4_7.

34. Мастеров ОС, Калмиков СА. Аналіз результатів корекції гіперглікемії при цукровому діабеті 2 типу засобами фізичної терапії. *Фізична реабілітація та рекреаційно-оздоровчі технології*. 2017; 1: 44-52.

35. Мойбенко ОО, Юзьків МЯ, Коцюрuba АВ, Буханевич ОМ, Тумановська ЛВ. Зміни системи оксиду азоту при гострій ішемії та реперфузії міокарда. *Фізіол. журн*. 2000; 46(6): 3-11.

36. Мойбенко ОО, Сагач ВФ, Ткаченко ММ, Коркушко ОВ, Безруков ВВ, Кульчицкий ОК, та ін. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань. *Фізіол. журн*. 2004; 50(1): 11-30.

37. Наказ МОЗ України від 21.12.2012 р., № 1118. Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при цукровому діабеті 2 типу. Уніфікований клінічний протокол первинної та вторинної (спеціалізованої) медичної допомоги «Цукровий діабет тип 2». Київ; 2012. 118 с.

38. Паньків ВІ. Класифікація, діагностика і сучасні підходи до лікування діабетичної поліневропатії. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2008; 6(18):58-62.

39. Паньків ВІ. Нові рекомендації Американської діабетичної асоціації 2018 року з діагностики та лікування цукрового діабету. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2018; 14(1): 93-98. DOI: 10.22141/2224-0721.14.1.2018.127099.

40. Паньків ВІ. Цукровий діабет: визначення, класифікація, епідеміологія, фактори ризику. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2013; 7(55): 95-104.

41. Паньків ВІ. Цукровий діабет: діагностичні критерії, етіологія і патогенез. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2013; 8(56): 53-64.

42. Пасечко НВ, Наумова ЛВ, Мартинюк ЛП. Стан компенсації цукрового діабету у хворих у тернопільській області. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2011; 2(35):51-53.

43. Перерва ЛА. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 2-го типа. *Ліки України*. 2014; 10: 27-8.

44. Савицький ІВ, Сарахан ВМ, Кузьменко ІА, Якимчук НВ. Експериментальне дослідження цукрового діабету: особливості методик моделювання. *Укр журн мед, біол та спорту*. 2017; 6: 41-5.

45. Савицький ІВ., Шпак ВС., Величко ВІ, Свірський ОО. Стимуляція розвитку ендокринної системи похідними оксиду азоту. *Акт пробл транспорт мед*. 2012;2(28):129-32.

46. Синяченко ОВ. Диагностика и лечение болезней суставов. СПб.: ЭЛБИ-СПб ;2012. 562 с.

47. Сулаєва ОМ, Гончаров СВ, Ларін АС. Поліморфізм генів, залучених у регуляцію ендотеліального гомеостазу, і кардіометаболічні ризики у хворих на цукровий діабет 2 типу. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018; 2(62):9-14. DOI.org/10.24026/1818-1384.2(62).2018.135451.

48. Тронько НД, Караченцев ЮІ, Соколова ЛК, Кравчун НА. Актуальные аспекты инсулинотерапии у пациентов с сахарным диабетом. *Ендокринологія*. 2016; 21(2): 100-7.

49. Тронько НД, Соколова ЛК, Власенко МВ, Костюкевич АА. Достижение целей лечения пациентами с сахарным диабетом в Украине. Результаты Международного исследования по изучению практики ведения сахарного диабета (IDMPS). *Ендокринологія*. 2015; 20(4): 658-68.

50. Шоріков ЄІ. Тромбоцитарно-ендотеліальна молекула адгезії як предиктор дисфункції ендотелію при артеріальній гіпертензії з цукровим діабетом II типу. Здобутки клінічної і експериментальної медицини [Інтернет]. 2015. [цитовано 2019 Берез. 21]; 4: 76-80. Доступно на: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zkem_2015_4_22.

51. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2017; 40 (Supplement 1): S11-S24. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc17-S005>.

52. Atay AE, Akbas H, Tumer C, Sakar MN, Esen B, Incebiyik A, [et al.] The association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and serum nitric oxide concentration with microalbuminuria in patients with gestational diabetes. *ClinNephrol*. 2014;81(2):105-11.

53. Babik B, Peták F, Agócs S, Blaskovics I, Alács E, Bodó K, [et al.] Diabetes mellitus: endothelial dysfunction and changes in hemostasis. *OrvHetil*. 2018; 159(33):1335-1345. DOI: 10.1556/650.2018.31130.

54. Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol*. 2014; 2: 170-7.

55. Baron AD, Laakso M, Brechtel G, Edelman SV. Mechanism of insulin resistance in insulin dependent diabetes mellitus: a major role for reduced skeletal muscle blood flow. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;73:637–43.

56. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287:2570–81. DOI: 10.1001/jama.287.19.2570.

57. Behnam-Rassouli M, Ghayour MB, Ghayour N. Microvascular complications of diabetes. *J Biol Sci*. 2010;10:411–23. DOI: 10.3923/jbs.2010.411.423.

58. Bermejo-Martin JF, Martín-Fernandez M, López-Mestanza C, Duque P, Almansa R. Shared Features of Endothelial Dysfunction between Sepsis and Its Preceding Risk Factors (Aging and Chronic Disease). *J Clin Med*. 2018; 7(11). pii: E400. DOI: 10.3390/jcm7110400.

59. Blum A, Socea D, Sirchan R. Vascular responsiveness in type 2 diabetes mellitus (T2DM). *QJM*. 2016; 109(12): 791-796. DOI: 10.1093/qjmed/hcw081

60. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes*. 2005;54:3458–65.

61. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:168–75.
62. Boulton AJ, Vileikyte L, RagnarsonTennvall G, Apel-qvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet.* 2005; 366: 1719–24; DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S01406736\(05\)67698-2](http://dx.doi.org/10.1016/S01406736(05)67698-2).
63. Boulton AJM, Armstrong DG, Albert SF, Frykberg R. Comprehensive foot examination and risk assessment. *Diabetes Care.* 2008; 31: 1679–85; DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-9021>.
64. Bregar D, Cilenšek I, Mankoč S, Reschner A, Petrovič D, Globočnik-Petrovič M. The joint effect of the endothelin receptor B gene (EDNRB) polymorphism rs10507875 and nitric oxide synthase 3 gene (NOS3) polymorphism rs869109213 in Slovenian patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018;18(1): 80-6. doi: 10.17305/bjbms.2017.2244.
65. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414: 813-20.
66. Brownlee M. The pathobiology of diabetes complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005; 54: 1615-25
67. Bruno G, Runzo C, Cavallo-Perin P, Merletti F, Rivetti M, Pinach S, et al. Incidence of Type 1 and Type 2 Diabetes in Adults Aged 30–49 Years: The population-based registry in the province of Turin, Italy. *Diabetes Care.* 2005; 28: 2613–19. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.28.11.2613>.
68. Campedelli FL, E Silva KSF, Rodrigues DA, Martins JVM, Costa IR, Lagares MH, et al. Polymorphism of the gene eNOS G894T (Glu298Asp) in symptomatic patients with atherosclerosis. *Genet Mol Res.* 2017; 16(2). DOI: 10.4238/gmr16029550.
69. Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vasc Pharmacol.* 2012; 57: 91–7.
70. Cardiovascular Diseaseand Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetesd 2018. *Diabetes Care.* 2018; 41 (Suppl. 1): S86–S104.

DOI.org/10.2337/dc18-S009.

71. Carrizzo A, Izzo C, Oliveti M, Alfano A, Virtuoso N, Capunzo M, et al. The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(10): pii: E2968. DOI: 10.3390/ijms19102968.

72. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect.* 2004; 6: 1219-25.

73. Chen S, Apostolova MD, Cherian MG, Chakrabarti S. Interaction of endothelin-1 with vasoactive factors in mediating glucoseinduced increased permeability in endothelial cells. *Lab Invest.* 2000; 80: 1311–21

74. Chernobrytsev OP. The endothelial dysfunction factors in diabetes mellitus 2 type. *Journal of Education, Health and Sport.* 2019;9(1):410-6.

75. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kid Dis* 2013; 41(1), 1–12. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/ajkd.2003.5000.93>.

76. Corey E. Tabit, Chung Wiilliam B., Hamburg Naomi M., Vita Joseph A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Ednocr Metab Disord.* 2010;11 (1): 61-74.

77. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Circulation.* 2003; 108: 1527–32. DOI: 10.1161/01.CIR.0000091257.27563.32.

78. Cutiongco MFA, Chua BMX, Neo DJH, Rizwan M, Yim EKF. Functional differences between healthy and diabetic endothelial cells on topographical cues. *Biomaterials.* 2018; 153:70-84. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.10.037.

79. D’Souza A, Hussain M, Howarth FC, Woods NM, Bidasee K, Singh J. Pathogenesis and pathophysiology of accelerated atherosclerosis in the diabetic

heart. *Mol Cell Biochem.* 2009;331:89-116.

80. Davenport AP, Hyndman Kelly A, Neeraj Dhaun, Christopher Southan, Donald E. Kohan, Jennifer S, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev.* 2016; 68: 357–418; DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>.

81. Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, et al. Geltrude Mingrone Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia.* 2018; 61: 2461–98. DOI.org/10.1007/s00125-018-4729-5.

82. Dean J. Organising care for people with diabetes and renal disease. *J Ren Care* 2012; 38 (Suppl 1): 23–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-6686.2012.00272.x>.

83. DeFronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, Alberti G. International Textbook of Diabetes Mellitus, 2 Volume Set. 4th Edition. New York :Wiley-Blackwell; 2015. 1203 p.

84. Dhamodharan U, Viswanathan V, Krishnamoorthy E, Rajaram R, Aravindhavan V. Genetic association of IL-6, TNF- α and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. *Gene.* 2015; 565(1): 62-7. DOI: 10.1016/j.gene.2015.03.063.

85. Dhananjayan R, Srivani Koundinya KS, Malati T, Vijay Kumar Kutala. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Ind J Clin Biochem.* 2016; 31(4): 372–379. DOI 10.1007/s12291-015-0516-y.

86. Dhaun N, Melville V, Blackwell S, Talwar DK, Johnston NR, Goddard J, et al. Endothelin-A receptor antagonism modifies cardiovascular risk factors in CKD. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 2013; 24(1): 31-6.

87. Doody NE, Dowejko MM, Akam EC, Cox NJ, Bhatti JS, Singh P, et al. The Role of TLR4, TNF- α and IL-1 β in Type 2 Diabetes Mellitus Development within a North Indian Population. *Ann Hum Genet.* 2017; 81(4): 141-146. DOI: 10.1111/ahg.12197.

88. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME. Effects of free fatty

acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 1999;103:253–9.

89. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 2006;116:1071–80.

90. Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve.* 1988; 11(1): 21-32. DOI: 10.1002/mus.880110106.

91. Dymkowska D. Oxidative damage of the vascular endothelium in type 2 diabetes - the role of mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Postepy Biochem.* 2016; 62(2): 116-26.

92. El-Lebedy D. Interaction between endothelial nitric oxide synthase rs1799983, cholesteryl ester-transfer protein rs708272 and angiopoietin-like protein 8 rs2278426 gene variants highly elevates the risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *CardiovascDiabetol.* 2018; 17(1): 97. DOI: 10.1186/s12933-018-0742-8

93. ESC. Clinical Practice Guidelines [Internet]. 2018 [cited 2019 March 21]. Available from: <https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines>.

94. European Heart Network. European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. [Internet]. 2017 [cited 2019 March 21]. Available from: <http://www.ehnheart.org/cvd-statistics>.

95. Evans JM, Newton RW, Ruta DA, MacDonald TM, Morris AD. Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 2000; 17: 478–80. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.14645491.2000.00309.x>. 14.

96. Fakhruddin S, Alanazi W, Jackson KE. Diabetes-Induced Reactive Oxygen Species: Mechanism of Their Generation and Role in Renal Injury. *Journal of Diabetes Research.* 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8379327>.

97. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H985–1002.
98. Feletou M. The endothelium, part I: multiple functions of the endothelial cells—focus on endothelium-derived vasoactive mediators. In colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function. Morgan Claypool Life Sci. 2011; 3: 1–306.
99. Fendler W, Borowiec M, Baranowska-Jazwiecka A, Szadkowska A, Skala-Zamorowska E, Deja G. et al. Prevalence of monogenic diabetes amongst Polish children after a nationwide genetic screening campaign. *Diabetologia*. 2012; 55: 2631–35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2621-2>.
100. Feng B, Cao Y, Chen S, Ruiz M, Chakrabarti S. Reprint of: miRNA-1 regulates endothelin-1 in diabetes. *Life Sci*. 2014; 118: 275–80.
101. Ferreiro JL, Gomez-Hospital JA, Angiolillo DJ. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2010; 7: 251–9.
102. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1282–91.
103. Ferroni P, Della-Morte D, Pileggi A, Riondino S, Rundek T, Ricordi C, et al. Pleiotropic effects of PPAR γ agonist on hemostatic activation in type 2 diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013; 11: 338–51.
104. Förstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol*. 2011; 164(2): 213–23.
105. Fumeron F, Reis AF, Velho G. Genetics of macrovascular complications in diabetes. *Current Diabetes Reports*. 2006; 6 (2): 162–168.
106. Gaiz A, Mosawy S, Colson N, Singh I. Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity. *Biomed Pharmacother*. 2017; 94: 679–86.
107. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple

serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2004; 18: 2024–34.

108. Georgianos PI, Agarwal R. Endothelin A receptor antagonists in diabetic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017; 26 (5): 338-44. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000342.

109. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010; 107: 1058–70.

110. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetesd 2018. *Diabetes Care*. 2018; 41(Suppl.1): S55–S64.DOI.org/10.2337/dc18-S006.

111. Goncalves FZ, Lizarte Neto FS, Novais PC, Gattas D, Lourenço LG, de Carvalho CAM, et al. Expression profile of endothelin receptors (ETA and ETB) and microRNAs-155 and -199 in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res*. 2018; 51(3): e6329. DOI: 10.1590/1414-431X20176329.

112. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med*. 2007; 262: 157–72.

113. Hameed I, Masoodi SR, Malik PA, Mir SA, Ghazanfar K, Ganai BA. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression. *Gene*. 2018; 661: 51-59. DOI: 10.1016/j.gene.2018.03.095.

114. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2153–7.

115. Hazel L, Kenneth A, Roebuck O. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280: C719–41.

116. Holman N, Young B, Gadsby R. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2015; 32: 1119–20. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/dme.12791>.

117. Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs DR Jr. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA*. 2008; 299: 2287–93.

118. Hunley TE, Iwasaki S, Homma T, Kon V. Nitric oxide and endothelin

in pathophysiological settings. *Pediatr. Nephrol.* 1995; 9(2): 235-44.

119. Huo P, Zhang D, Guan X, Mei Y, Zheng H, Feng X. Association between genetic polymorphisms of ACE & eNOS and diabetic nephropathy. *Mol Biol Rep.* 2015; 42 (1): 27-33. DOI: 10.1007/s11033-014-3736-y

120. Ignarro J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990; 30: 535-60.

121. Il'yasova D, Spasojevic I, Base K, Zhang H, Wang F, Young SP, et al. Urinary F2-isoprostanes as a biomarker of reduced risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2012; 35: 173–4.

122. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018; 100: 1-19. DOI: 10.1016/j.vph.2017.05.005.

123. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu H Y, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000; 49: 1939–45.

124. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th Edition [Internet]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017 [cited 2019 March 21]. Available from: www.diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html.

125. International Diabetes Federation. The Diabetic Retinopathy Barometer Report: Global Findings. 2017 [Internet]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017 [cited 2019 March 21]. Available from: www.drbarometer.com.

126. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes — 2018. *Diabetes Care.* 2018; 41(1): 1-2. DOI: 10.2337/dc18-Sint01.

127. Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. An emerging role for microRNA in the regulation of endothelin-1. *Front Physiol.* 2013; 4: 22.

128. Jamil K, Jayaraman A, Ahmad J, Joshi S, Yerra SK. TNF-alpha -308G/A and -238G/A polymorphisms and its protein network associated with type

2 diabetes mellitus. *Saudi J Biol Sci.* 2017; 24(6):1 195-1203. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.05.012.

129. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kB. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28: 1317–27.

130. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun. Rev.* 2006; 5: 195–201.

131. Jia Z, Zhang X, Kang S, Wu Y. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Endocr J.* 2013; 60(7): 893-901.

132. Jove M, Planavila A, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Palmitate induces tumor necrosis factor- α expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor- κ B activation. *Endocrinology.* 2006; 147: 552–61.

133. Just A, Whitten CL, Arendshorst WJ. Reactive oxygen species participate in acute renal vasoconstrictor responses induced by ETA and ETB receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294: 719–28.

134. Kaidonis G, Craig JE, Gillies MC, Abhary S, Essex RW, Chang JH, et al. Promoter polymorphism at the tumour necrosis factor/lymphotoxin- α locus is associated with type of diabetes but not with susceptibility to sight-threatening diabetic retinopathy. *Diab Vasc Dis Res.* 2016; 13(2): 164-7. DOI: 10.1177/1479164115616902.

135. Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. *Int J endocrinol.* 2011; 2011: 742719.

136. Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4: 1061–8.

137. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 998–1005.

138. Kawashima S. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium*. 2004; 11: 99–107.
139. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2013; 3(1):1-150.
140. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the doubleedged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 851–76.
141. Keenoy BMY, Vertommen J, De Leeuw I. Divergent effects of different oxidants on glutathione homeostasis and protein damage in erythrocytes from diabetic patients: effects of high glucose. *Mol Cell Biochem*. 2001; 225: 59–73.
142. Keri KC, Samji NS, Blumenthal S. Diabetic nephropathy: newer therapeutic perspectives. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2018; 8(4): 200–7. DOI: 10.1080/20009666.2018.1500423.
143. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 9114–9.
144. Kim F, Tysseling KA, Rice J. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKK beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 989–94.
145. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006; 113: 1888–904.
146. Klabunde RE. Cardiovascular Physiology Concepts [Internet]. 2016 [cited 2019 March 21]. Available from: <https://www.cvphysiology.com/BloodFlow/BF012.htm>.
147. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*. 2004; 500: 255–266. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.07.030.
148. Knapp M, Tu X, Wu R. Vascular endothelial dysfunction, a major

mediator in diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin.* 2018. DOI: 10.1038/s41401-018-0042-6.

149. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1667–75.

150. Largay J. Case Study: NewOnset Diabetes: How to Tell the Difference Between Type 1 and Type 2 Diabetes. *Clin Diabetes.* 2012; 30: 25–6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0182088>.

151. Lee WH, Kim SH, Lee Y, Kwon B, Song H, Kwon BS, et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 2004-10.

152. Leontis Lisa M, Hess-Fischl Amy. Type 2 Diabetes Complications. [Internet]. 2018 [cited 2019 March 21]. Available from: <https://www.endocrineweb.com/conditions/type-2-diabetes/type-2-diabetes-complications>.

153. Li J, Wei J, Xu P, Yan M. Impact of diabetes-related gene polymorphisms on the clinical characteristics of type 2 diabetes Chinese Han population. *Oncotarget.* 2016; 7(51): 85464-71.

154. Li JY, Tao F, Wu XX, Tan YZ, He L, Lu H. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes contribute to the development of type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *Genet Mol Res.* 2015; 14(4): 2993-3002. DOI: 10.4238/2015.October.21.20.

155. Li TY, Rana JS, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Obesity as compared with physical activity in predicting risk of coronary heart disease in women. *Circulation.* 2006; 113: 499-506.

156. Li W, Abdul Y, Ward R, Ergul A. Endothelin and diabetic complications: a brain-centric view. *Physiol Res.* 2018; 67(Supp. 1): S83-S94.

157. Lian K, Guo X, Huang Q, Tan Z, Xia C, Wang R, et al. Reduction Levels and the Effects of High-Molecular-Weight Adiponectin via AMPK/eNOS

in Chinese Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2016; 124(9): 541-547. DOI: 10.1055/s-0042-109262.

158. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105(9): 1135–43.

159. Liochev SI, Fridovich I. The role of $O_2^{\bullet-}$ in the production of HO^{\bullet} : in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 1994; 6: 29–33.

160. Liu ZH, Ding YL, Xiu LC, Pan HY, Liang Y, Zhong SQ, et al. A meta-analysis of the association between TNF- α -308G>A polymorphism and type 2 diabetes mellitus in Han Chinese population. *PLoS One*. 2013; 8(3): e59421. DOI: 10.1371/journal.pone.0059421.

161. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005; 307: 384–387.

162. Luna GI, da Silva IC, Sanchez MN. Association between -308G/A TNFA Polymorphism and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *J Diabetes Res*. 2016; 2016: 6309484.

163. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin. Cardiol*. 1997; 20 (11, suppl. 2): 3-10.

164. Maahs DM, West NA, Lawrence JM. Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010; 39: 481–97. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.011>.

165. Madonna R, Balistreri CR, Geng YJ, De Caterina R. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascul Pharmacol*. 2017; 90: 1-7.

166. Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes-part I: pathways of vascular disease in diabetes. *Vasc Pharmacol*. 2011; 54: 68–74.

167. Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T, et al. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects relationship to microvascular complications. *J Diabetes Complic*. 2001; 15: 135–43.

168. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M,

[et al.] 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*. 2013; 31(7): 1281-1357.

169. Martínez-Barquero V, de Marco G, Martínez-Hervas S, Rentero P, Galan-Chilet I, Blesa S, et al. Polymorphisms in endothelin system genes, arsenic levels and obesity risk. *PLoSOne*. 2015; 10(3): e0118471. DOI: 10.1371/journal.pone.0118471.

170. Matsumoto T, Ishida K, Nakayama N, Kobayashi T, Kamata K. Involvement of NO and MEK/ERK pathway in enhancement of endothelin-1-induced mesenteric artery contraction in later-stage type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296: H1388–97.

171. Meigs JB, Larson MG, Fox CS, Keaney JF Jr, Vasan RS, Benjamin EJ. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2007; 30(2929–35): 155.

172. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetesd 2018. *Diabetes Care*. 2018; 41(Suppl.1): S105–S118. DOI.org/10.2337/dc18-S010.

173. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001; 5(1): 62-71. DOI: 10.1006/niox.2000.0319.

174. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 176: 213–54.

175. Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. The role of reactive oxygen species in TNFalpha-dependent expression of the receptor for advanced glycation end products in human umbilical vein endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1744: 213–23. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2005.03.007.

176. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes.

Biochem Biophys Res Commun. 1990; 173(3): 932–9.

177. Muniyappa R, Sowers JR. Roles of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14:5–12.

178. Nadeem A, Mumtaz S, Naveed AK, Mansoor Q, Aslam M, Ismail M. Association of ADIPOQ C-11377G (rs266729), TNF- α G-308A (rs1800629) and TNF- α G-238A (rs361525) single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Pakistani population. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2017; 27(10): 625–30.

179. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 842–51.

180. Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Sung-woo Ha, Suzuma K, Way KJ, et al. Activation of vascular protein kinase C- β inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes.* 2006; 55: 691–8.

181. Natali A, Taddei S, Galvan AQ, Camastra S, Baldi S, Frascerra S, et al. Insulin sensitivity, vascular reactivity, and clamp-induced vasodilatation in essential hypertension. *Circulation.* 1997; 96: 849–55.

182. Natali E, Toschi S, Baldeweg D, Ciociaro D, Favilla S, Saccà L, et al. Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006; 55: 1133–40.

183. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* 1994; 79: 915–8.

184. Nemoto S, Taguchi K, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T. Aminoguanidine normalizes ET-1-induced aortic contraction in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats by suppressing Jab1-mediated increase in ET(A)-receptor expression. *Peptides.* 2012; 33: 109–19.

185. Nesto RW. Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: current concepts. *Am J Med.* 2004; 116: 11–22. DOI: 10.1016/j.amjmed.2003.10.016.

186. Nitric Oxide [Internet]. 2011 [cited 2019 March 21]. Available from: <http://cology4u.blogspot.com/2011/06/nitric-oxide.html>.
187. Odegaard AO, Jacobs DR, Sanchez OA, Goff DC Jr, Reiner AP, Gross MD. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; 15: 51.
188. Panero F, Gruden G, Perotto M. Uric acid is not an independent predictor of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: a population-based study. *Atherosclerosis*. 2012; 221: 183–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.042>.
189. Park K, Gross M, Lee DH, Holvoet P, Himes JH, Shikany JM, et al. Oxidative stress and insulin resistance: the coronary artery risk development in young adults study. *Diabetes Care*. 2009; 32: 1302–7.
190. Patlak M. New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. *FASEB J*. 2002;16:1853.
191. Peerapatdit T, Patchanans N, Likidlilid A, Poldee S, Sriratanasathavorn C. Plasma lipid peroxidation and antioxidant nutrients in type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thai*. 2006; 89: S147–55.
192. Pi X, Xie L, Patterson C. Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis. *Circ Res*. 2018; 123(4): 477-494. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313237.
193. Poirier P, Giles TD, Bray GA. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006; 113: 898–918.
194. Polovina MM, Potpara TS. Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders. *Postgrad Med*. 2014; 126(2): 38-53. DOI: 10.3810/pgm.2014.03.2739.
195. Porter KE, Riches K. The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in type 2 diabetes? *Clin Sci*. 2013; 125: 167–82.

196. Prentki M, Nolan CJ. Islet β cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116 (7): 1802–12.
197. Quehenberger A, Bierhaus P, Fasching C, Goff DC Jr, Reiner AP, Gross MD. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*. 2000; 49: 1561–70.
198. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med*. 1998; 105: 32–9.
199. Raminderjit Kaur, Manpreet Kaur, Jatinder Singh corresponding. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol*. 2018; 17: 121. DOI: [10.1186/s12933-018-0763-3].
200. Rani J, Mittal I, Pramanik A, Singh N, Dube N, Sharma S, et al. T2DiACoD: a gene atlas of type 2 diabetes mellitus associated complex disorders. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 6892. DOI: 10.1038/s41598-017-07238-0.
201. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1998; 37: 1595–607.
202. Rich S, McLaughlin VV. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; 108: 2184–90. DOI: 10.1161/01.CIR.0000094397.19932.78.
203. Rich SS. Genetics and its potential to improve type 1 diabetes care. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017; 24(4): 279-284. DOI: 10.1097/MED.0000000000000347.
204. Rovira-Llopis S, Banuls C, Diaz-Morales N, de Maranon AM. Low testosterone levels are related to oxidative stress, mitochondrial dysfunction and altered subclinical atherosclerotic markers in type 2 diabetic male patients. *Free Radic Biol Med*. 2017;108: 155-62.
205. Rürup C, Stobbe H. Determination of capillary lesions during diagnosis by means of the tourniquet test of microangiopathies in diabetes mellitus. *Schweiz Med Wochenschr*. 1979; 109(46): 1808-10.
206. Rürup C, Stobbe H. Simple diagnosis of diabetic microangiopathy by

means of the tourniquet test. *Z Gesamte Inn Med.* 1979; 34(24): 756-8.

207. Sadati SM, Radfar M, Hamidi AK, Abdollahi M, Qorbani M, Esfahani EN, et al. Association between the polymorphism of Glu298Asp in Exon 7 of the eNOS gene with foot ulcer and oxidative stress in adult patients with type 2 diabetes. *Can J Diabetes.* 2018; 42(1):18-22. DOI: 10.1016/j.jcjd.2017.03.001.

208. Sagar SK, Zhang C, Guo Q, Yi R. Lin-Tang. Role of expression of endothelin-1 and angiotensin-II and hypoxia-inducible factor 1 in the kidney tissues of patients with diabetic nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2013;24:959–64.

209. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414: 799–806.

210. Sandoval YH, Atef ME, Levesque LO, Li Y, Anand-Srivastava MB. Endothelin-1 signaling in vascular physiology and pathophysiology. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014; 12(2): 202-14.

211. Schulze PC, Lee RT. Oxidative stress and atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports.* 2005; 7: 242-8.

212. Serebrovska TV, Portnychenko AG, Drevytska TI, Portnichenko VI, Xi L, Egorov E, et al. Intermittent hypoxia training in prediabetes patients: Beneficial effects on glucose homeostasis, hypoxia tolerance and gene expression. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017; 242(15): 1542-1552. DOI: 10.1177/1535370217723578.

213. Serebrovska TV, Portnychenko AG, Portnichenko VI, Xi L, Egorov E, Antoniuk-Shcheglova I, et al. Effects of intermittent hypoxia training on leukocyte pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK-1) mRNA expression and blood insulin level in prediabetes patients. *Eur J Appl Physiol.* 2019; 119(3): 813-23. DOI: 10.1007/s00421-019-04072-2.

214. Sesti LF, Crispim D, Canani LH, Polina ER, Rheinheimer J, Carvalho PS, et al. The -308G>a polymorphism of the TNF gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasian Brazilians with type 2 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56(2): 1184-90. DOI: 10.1167/iovs.14-15758.

215. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol.* 2009; 578: 3-22. DOI: 10.1007/978-1-60327-411-1_1.
216. Sinisalo J, Paronen J, Matilla KJ. Relation of inflammation to vascular function in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2000; 149 (2): 403–11.
217. Sinyachenko OV, Ziablitsev SV, Chernobryvtsev PA. Endothelial dysfunction in glomerulonephritis. Donetsk: New World; 2006.152 p. In Russian.
218. Staiger H, Machicao F, Fritsche A, Haring HU. Staiger H, Machicao F, et al. *Endocr Rev.* 2009; 30(6): 557-85. DOI: 10.1210/er.2009-0017.
219. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J.* 2011; 25: 16–28.
220. Su Y, Liu XM, Sun YM, Jin HB, Fu R, Wang YY, et al. The relationship between endothelial dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes. *Int J Clin Pract.* 2008; 62: 877–82.
221. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34: 1508–12.
222. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I. *Circulation.* 2003;108: 1917–23.
223. Tabatabaei-Malazy O, Khodaeian M, Bitarafan F, Larijani B, Amoli MM. Polymorphisms of Antioxidant Genes as a Target for Diabetes Management. *Int J Mol Cell Med.* 2017; 6(3): 135-147. DOI: 10.22088/acadpub.BUMS.6.3.135.
224. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11(1): 61–74.
225. Tang ZH, Fang Z, Zhou L. Human genetics of diabetic vascular complications. *J Genet.* 2013; 92(3): 677-94.
226. Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun.* 2005; 73: 2496-503.
227. Tavares NA, Santos MM, Moura R, Araújo J, Guimarães RL,

Crovella S, et al. Association of TNF- α , CTLA4, and PTPN22 polymorphisms with type 1 diabetes and other autoimmune diseases in Brazil. *Genet Mol Res*. 2015; 14(4): 18936-44. DOI: 10.4238/2015.December.28.42.

228. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol*. 1992; 263: 321–6.

229. Toda N, Imamura T, Okamura T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther*. 2010; 127(3): 189-209.

230. Umans JG, Levi R. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Ann. Rev. Physiol*. 1995; 57: 771-790.

231. Umapathy D, Krishnamoorthy E, Mariappanadar V, Viswanathan V, Ramkumar KM. Increased levels of circulating (TNF- α) is associated with (-308G/A) promoter polymorphism of TNF- α gene in Diabetic Nephropathy. *Int J Biol Macromol*. 2018; 107(PtB): 2113-21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.078.

232. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002; 105: 546–9.

233. Vessieres E., Guihot A.L., Toutain B. COX2-derived prostanoids and oxidative stress additionally reduce endothelium-mediated relaxation in old type 2 diabetic rats. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e68217.

234. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman E. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004; 25: 612–28.

235. Volpe M. Microalbuminuria screening in patients with hypertension: recommendation for clinical practice. *Int J ClinPract*. 2008; 62 (1): 97–108.

236. Wang XL, Zhang L, Youker K, Zhang MX, Wang J, LeMaire SA, et al. Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes*. 2006; 55: 2301–10.

237. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens*. 1995; 4: 12-22.

238. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene

expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280: 685–94.

239. Wei Wang, Amy CY. Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6): 1816. DOI: 10.3390/ijms19061816.

240. Westergren HU, Svedlund S, Momo RA, BlomsterJ, Wåhlander K, Rehnströmet E, et al. Insulin resistance, endothelial function, angiogenic factors and clinical outcome in nondiabetic patients with chest pain without myocardial perfusion defects. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15: 36.

241. Willey KE, Davenport AP. Nitric oxide-medulation of the E-1 signaling pathway in cardiovascular system. *Brit. J. Pharmacology.* 2001; 132: 213-220.

242. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, et al. ESC Scientific Document Group (2018) 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 2018; 39(33): 3021–104.

243. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia : report of a WHO/ IDF consultation. World Health Organization; 2006: 50.

244. Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J.* 2003; 17: 1289–91.

245. Xu S., Liu X., Ming J., Ji Q. Comparison of exenatide with biphasic insulin aspart 30 on glucose variability in type 2 diabetes: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2016;17:160. DOI: 10.1186/s13063-016-1258-8.

246. Yan ZP, Ma JX. Risk factors for diabetic retinopathy in northern Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Ophthalmol.* 2016; 9(8): 1194-99. DOI: 10.18240/ijo.2016.08.17.

247. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2012; 35: 556–64. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/dc111909>.

248. Zambrano-Galván G, Reyes-Romero MA, Lazalde B, Rodríguez-

Morán M, Guerrero-Romero F. Risk of microalbuminuria in relatives of subjects with diabetic nephropathy: a predictive model based on multivariable dimensionality reduction approach. *ClinNephrol*. 2015; 83(2): 86-92. DOI: 10.5414/CN10839.

249. Zanatta CM, Crispim D, Sortica DA, Klassmann LP, Gross JL, Gerchman F, et al. Endothelin-1 gene polymorphisms and diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr*. 2015; 7: 103. DOI: 10.1186/s13098-015-0093-5.

250. Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Ann Med*. 2016; 49: 106-16; DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07853890.2016.1231932>.

251. Zhang X, McGeoch SC, Johnstone AM, Holtrop G, Sneddon AA, Macrury SM. Platelet-derived microparticle count and surface molecule expression differ between subjects with and without type 2 diabetes, independently of obesity status. *J Thromb Thrombolysis*. 2014; 37: 455–63.

252. Zhao Y, Li Z, Zhang L, Zhang Y, Yang Y, Tang Y, et al. The TNF-alpha -308G/A polymorphism is associated with type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *MolBiol Rep*. 2014; 41(1):73-83. DOI: 10.1007/s11033-013-2839-1.

253. Ziablitsev SV, Mokrii VY, Cristal MV. The value of polymorphism Pro12Ala gene in violation of lipid peroxidation and antioxidant protection in patient with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Education, Health and Sport formerly of Health Sciences*. 2016; 6(9): 626-636.

254. Ziablitsev SV, Uzvenko TU, Chernobrivtsev OP, Grishov AA, Palamar S, Ziablitsev DS. Influence of rs1137101 gene polymorphism of leptin receptor on the development of diabetes mellitus type 2 and obesity. *Фізіол. журн*. 2018; 64 (6): 3-8.

ДОДАТКИ

Додаток А

Акти впровадження результатів роботи у науковій та практичній діяльності



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Інституту фізіології
ім. О.О. Богомольця НАН України
акад. НАН України, д.б.н.

О.О. Кришталь

" 12 " *квітня* 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Найменування пропозиції: Результати дисертаційної роботи на здобуття вченого ступеня кандидата медичних наук Чернобривцева Олександра Петровича «Роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу» в наступному вигляді:

1. Характер та розподіл судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет 2-го типу;
2. Механізми ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу;
3. Роль поліморфізму генів, що мають відношення до регуляції функції ендотелію, при цукровому діабеті 2-го типу.

Ким та коли запропоновано: Чернобривцев Олександр Петрович, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, 2019 р.

Джерело інформації: Дисертаційна робота Чернобривцева Олександра Петровича «Роль генетичного поліморфізму у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу», наукові публікації Чернобривцева О.П. в «Фізіологічному журналі», «Міжнародному ендокринному журналі», журналі «Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія» у 2018-2019 р.р.

Де впроваджено: Результати впроваджені у практику наукових досліджень відділу фізіології кровообігу для пояснення механізмів пошкодження функції ендотелію при цукровому діабеті 2-го типу.

Термін впровадження: протягом 2018-2019 років.

Ефективність впровадження: Одержана додаткова наукова інформація щодо механізмів ендотеліальної дисфункції і ролі генетичного поліморфізму при цукровому діабеті 2-го типу.

Завідувач відділу фізіології кровообігу,
Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України,
доктор медичних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

В.Ф. Сагач

Продовж. дод. А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Перший проректор Національного
 медичного університету імені
 О.О. Богомольця,
 проф. _____ Ю.Л. Кученко
 _____ 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Чернобрицев О.П.
3. **Джерело інформації:** 1) Зябліцев СВ, Чернобрицев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14(7).661-7. 2) Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобрицев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медицина України*. 2018;14(1-2):34-39. 3) Зябліцев СВ, Чернобрицев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі патологічної фізіології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну», «Патофізіологія серцево-судинної системи».
5. **Терміни впровадження:** 2018-2019 навч. рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри від 19 лютого 2019 р., протокол № 21.

Відповідальний за впровадження:
 професор кафедри патофізіології
 Національного медичного університету
 імені О.О. Богомольця,
 д.мед.н., професор



Зябліцев С.В.

Продовж. дод. А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. проректора з науково-педагогічної роботи
Одеського національного медичного університету
д.мед.н., професор Р. С. Вастьянов

«15» квітня 2019 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Чернобривцев О.П.
3. **Джерело інформації:** 1) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14(7).661-7. 2) Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медицина науки України*. 2018;14(1-2):34-39. 3) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі загальної та клінічної патологічної фізіології імені В.В. Подвисоцького Одеського національного медичного університету при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темою «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну».
5. **Терміни впровадження:** 2018-2019 навч. рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Чернобривцева О.П. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри 04.02. 2019 р., протокол № 7

Відповідальний за впровадження:
професор кафедри патологічної фізіології
імені В.В. Подвисоцького
Одеського національного медичного університету
д.мед.н., професор



Савицький І.В.

Продовж. дод. А

Дворник В.М.
2019 р.**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Черnobривцев О.П.
3. **Джерело інформації:** 1) Зябліцев СВ, Черnobривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14(7):661-7. 2) Зябліцев СВ, Панова ТІ, Черnobривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медицина України*. 2018;14(1-2):34-39. 3) Зябліцев СВ, Черnobривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії МОЗ України при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темою «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну», «Патофізіологія серцево-судинної системи».
5. **Терміни впровадження:** вересень-грудень 2018 р.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Черnobривцева О.П. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Обговорено** на засіданні кафедри 6.02.2019 р., протокол №12.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патофізіології
Української медичної
стоматологічної академії,
д. мед. н., професор

В.О. Костенко

Продовж. дод. А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної роботи
ДНУЗ «Тернопільський державний
медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»

професор Шульгай А.Г.

2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Чернобривцев О.П.
3. **Джерело інформації:** 1) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14(7):661-7. 2) Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медицина України*. 2018;14(1-2):34-39. 3) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
4. **Де впроваджено:** На кафедрі патологічної фізіології ДНУЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну».
5. **Терміни впровадження:** 2018-2019 навчальний рік.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Чернобривцева О.П. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про механізми ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
7. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри 18 лютого 2019 р., протокол № 2

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри патологічної фізіології ДНУЗ

«Тернопільський державний медичний
університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України»,

д.мед.н., професор

Денефіль О.В.

Продовж. дод. А



ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи Запорізького державного медичного університету

професор

Туманський В.О.

«17» квітня 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Чернобривцев О.П.
3. **Джерело інформації:** 1) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14(7):661-7. 2) Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медична наука України*. 2018;14(1-2):34-39. 3) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Запорізький державний медичний університет, кафедра патологічної фізіології (протокол № 9 від 12.03.2019 р.).
5. **Терміни впровадження:** 2018-2019 навч. рік.
6. **Результати впровадження:** матеріали використовуються у навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та практичних заняттях за темами «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну», «Патологічна фізіологія серцево-судинної системи».
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносились

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри патологічної фізіології
Запорізького державного медичного університету
д.мед.н., професор

 А.В. Абрамов

Продовж. дод. А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного медичного
університету

д. мед. наук, професор В.Д. Марковський



2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів наукових досліджень Чернобривцева О.П.
в навчальний процес

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Чернобривцев О.П.

Джерело інформації:

- 1). Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14(7):661-7.
- 2). Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медицина науки України*. 2018;14(1-2):34-39.
- 3). Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
3. **Де впроваджено:** На кафедрі патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну», «Патофізіологія серцево-судинної системи».
4. **Терміни впровадження:** 2018-2019 навчальний рік.
5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Чернобривцева О.П. в навчальному процесі дозволило розширити знання студентів щодо механізмів формування ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті, зв'язку маркерів ендотеліальної дисфункції з тяжкістю захворювання.
6. **Зауваження та пропозиції:** Немає.
7. **Затверджено** на засіданні кафедри 14.03.2019 р., протокол № 3.

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна
Харківського національного медичного університету
д. мед. н., професор

О.В. Ніколаєва

Продовж. дод. А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Медичного інституту
Сумського державного університету
МОН України Лобода А.М.

« 9 » квітня 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
2. **Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Чернобривцев О.П.
3. **Джерело інформації:** 1) Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2018;14(7):661-7. 2) Зяблицев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медична наука України*. 2018;14(1-2):34-39. 3) Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Медичний інститут Сумського державного університету МОН України, кафедра фізіології і патофізіології з курсом медичної біології (протокол №17 від 19.03.2019 р.).
5. **Терміни впровадження:** 2018-2019 навч. рік.
6. **Результати впровадження:** матеріали використовуються у навчальному процесі кафедри – лекційному курсі та практичних заняттях за темами «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну».
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносились

Відповідальний за впровадження:


Професор кафедри фізіології і патофізіології
з курсом медичної біології,
д.б.н., професор



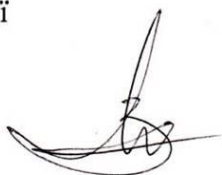
В. Ю. Гарбузова

Продовж. дод. А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Івано-Франківського національного
медичного університету д. мед. н., проф. Ерстенюк Г.М.
«13» жовтня 2019 р.**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ****матеріалів наукових досліджень Чернобривцева О.П.
в навчальний процес**

- Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
- Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патофізіології, асистент Чернобривцев О.П.
Джерело інформації: 1) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14(7):661-7. 2) Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медична наука України*. 2018;14(1-2):34-39. 3) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
- Де впроваджено:** На кафедрі патофізіології Івано-Франківського національного медичного університету при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темами «Патологічна фізіологія вуглеводного обміну», «Патофізіологія серцево-судинної системи».
- Терміни впровадження:** 2018-2019 навч. рік.
- Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Чернобривцева О.П. в навчальному процесі дозволило розширити знання студентів про механізми формування ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті, виявило зв'язок маркерів ендотеліальної дисфункції з тяжкістю захворювання.
- Зауваження та пропозиції:** Немає.
- Затверджено** на засіданні кафедри 26 березня 2019 р., протокол №10/1.

Відповідальний за впровадження:завідувач кафедри патологічної фізіології
Івано-Франківського національного
медичного університету
д.мед.н., професор

Л.М. Заяць

Продовж. дод. А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Перший проректор Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, д.мед.н., професор, член-кореспондент НАМН України
Ю.П. Вдовиченко
2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ в навчальний процес

- Назва впровадження:** Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу.
- Установа-розробник, автор:** Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра патолофізіології, асистент Чернобривцев О.П.
- Джерело інформації:** 1) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международный эндокринологический журнал*. 2018;14 (7). 661-7.2) Зябліцев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Медицина України*. 2018;14 (1-2):34-39. 3) Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2018;64(4):35-44.
- Де впроваджено:** На кафедрі патологічної та топографічної анатомії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика при проведенні лекційного курсу та практичних занять за темою «Патологічна анатомія ендокринної системи та порушення обміну речовин».
- Терміни впровадження:** 2018-2019 навч. рік.
- Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної та топографічної анатомії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика.
- Результати впровадження:** в навчальний процес - використання результатів наукових досліджень Чернобривцева О.П. в навчальному процесі дозволило розширити знання слухачів про механізми формування ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті, виявило зв'язок маркерів ендотеліальної дисфункції з тяжкістю захворювання.
- Зауваження та пропозиції:** Немає.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної та топографічної анатомії НМАПО імені П.Л. (протокол від 18.03.2019 № 4).

Відповідальний за впровадження:

Зав. кафедри патологічної та топографічної анатомії Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика
д.мед.н., професор

Дядик О.О.

Додаток Б

Список публікацій здобувача

1. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС, Стародубська ОО., Абряхімова ЦБ. Патогенетична роль ендотеліну-1 та поліморфізму його рецепторів при цукровому діабеті 2 типу. *Фізіол журн.* 2019;65(2):22-30. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
2. Chernobryvtsev OP. The endothelial dysfunction factors in diabetes mellitus 2 type. *Journal of Education, Health and Sport.* 2019;9(1):410-6. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
3. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Значення фактору некрозу пухлин альфа у механізмах розвитку нефропатії при цукровому діабеті 2 типу. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2019;65(1):72-80. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
4. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцева МВ. Структура ускладнень цукрового діабету 2 типу у залежності від його тяжкості. *Актуальні проблеми транспортної медицини.* 2019;55(1):130-7. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
5. Зябліцев СВ, Чернобривцев ОП, Зябліцев ДС. Поліморфізм rs1800629 гена TNF α при цукровому діабеті 2 типу. Зв'язок з розвитком нефропатії. *Международн ендокр журн.* 2019;15(1):24-30. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці*

результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).

6. Ziablitsev SV, Uzvenko TU, Chernobrivtsev OP, Grishov AA, Palamar S, Ziablitsev DS. Influence of rs1137101 gene polymorphism of leptin receptor on the development of diabetes mellitus type 2 and obesity. *Fiziol Zh.* 2018;64(6):3-8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*
7. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС. Показники ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2-го типу як визначальні чинники розвитку ускладнень. *Международ эндокр журн.* 2018;14(7):661-7. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
8. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Зяблицев ДС, Тарасенко СО. Зв'язок поліморфізму rs1799983 гена NOS3 з цукровим діабетом 2 типу та розвитком його ускладнень. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2018;64(4):35-44. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
9. Зяблицев СВ, Панова ТІ, Чернобривцев ОП. Зв'язок чинників ендотеліальної дисфункції з тяжкістю цукрового діабету 2 типу. *Мед наука України.* 2018;1-2:34-39. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів, формулюванні висновків і підготовці матеріалів статті до публікації).*
10. Зяблицев СВ, Могилевський СЮ, Бушуева ОВ, Чернобривцев ОП. Можлива роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 при діабетичній ретинопатії і цукровому діабеті 2 типу. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2017;58(2):34-8. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці*

результатів).

11. Зябліцев СВ, Чернобривцев ПА, Чернобривцев ОП, Антонов ЄВ. Вплив поліморфізму rs1137101 гена рецептора лептину на розвиток цукрового діабету 2-го типу. *Експ і клін мед.* 2016;71(2):86-90. *(Особистий внесок здобувача полягає у проведенні лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*
12. Зябліцев СВ, Ларін ОС, Новосельська ВВ, Дашук ТІ, Гаврюшенко ЛВ, Чернобривцев ОП. Управління технологічними процесами та критерії їх оцінки на етапах виконання лабораторних досліджень. *Клін ендокр та ендокр хір.* 2015;49(1):55-61. *(Особистий внесок здобувача полягає у розробці критерієв для оцінки лабораторних досліджень, статистичній обробці результатів).*

Продовж. дод. Б

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

13. Zyablitsev SV, Chernobryvtsev OP. Role of Endotelin-1 and polymorphism of its receptors in type 2 diabetes mellitus and its complications. Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка. 2019 р., м. Київ. *Фізіол журн.* 2019;65(3):101. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*
14. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП Вплив поліморфізмів rs1799983 гена NOS3 та rs1800629 гена TNFA на розвиток ендотеліальної дисфункції у хворих на цукровий діабет 2 типу. Тези VII Пленуму Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практична конференція «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», присвячені 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка. 10-12 жовтня 2018 р., м. Полтава. Полтава, 2018:32-3. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*
15. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Гришов АА, Паламар С. Поліморфізм генів проліфератора пероксисом гамма 2 типу (PPARG) та рецептора лептину (LEPR) обумовлюють розвиток цукрового діабету 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцкого. 24-25 травня 2018 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2018:93-4. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*
16. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП. Значення ендотеліну-1 у розвитку інсулінорезистентності і ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVII читання ім. В.В. Подвисоцкого. 24-25 травня 2018 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ

медицини транспорту. 2018:97-8. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*

17. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Піщуліна МІ. Варіабельність генів VEGF, NOS3, ІІ-1b та TNF α при цукровому діабеті 2 типу. Бюл. мат-лів научн. конф. XVI читання ім. В.В. Подвисоцького. 18-19 травня 2017 р., м. Одеса. Одеса: УкрНДІ медицини транспорту. 2017:137-8. *Форма участі – публікація тез, участь у постерній сесії.*
18. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП. Роль поліморфізму rs1799983 гена NOS3 у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті 2 типу. Мат-ли конф. присвяченій 105-й річниці від дня народження професора Я.Д. Киршенблата. 5-6 жовтня 2017 р., м. Чернівці. *Клінічна та експериментальна патологія.* 2017;61(3):44. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*
19. Зяблицев СВ, Чернобривцев ОП, Борис РМ. Поліморфізм генів, що мають відношення до розвитку ендотеліальної дисфункції, при цукровому діабеті 2 типу. Тези доп. VII нац. конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції». 5-7 жовтня 2016 р., м. Харків. Харків: Вид-во НФаУ. 2016:92. *Форма участі – публікація тез, усна доповідь.*