

УДК 616.379-008.64.575.174.015.3:576.8.095

## ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТФОРМИНА У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

**Ю.А. Сорокина,  
Л.В. Ловцова,  
О.В. Занозина,  
Д.В. Новиков,**  
ГБОУ ВПО «Нижегородская  
государственная медицинская  
академия»,  
Научно-исследовательский  
институт молекулярной  
биологии и региональной  
экологии Нижегородского  
государственного  
университета  
им. Н.И. Лобачевского

**Занозина Ольга Владимировна –  
e-mail: zwn2@mail.ru**

В настоящее время доказано, что различные комбинации генома определяют индивидуальную восприимчивость к различным препаратам. Нами предпринята попытка оценить вклад однонуклеотидных полиморфизмов гена, кодирующего эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы – hOGG1 и гена p53. Информация об ассоциации полиморфизмов данных генов с эффективностью метформина у больных сахарным диабетом 2-го типа в доступной литературе отсутствует. Показано, что наличие определённых полиморфизмов данных генов потенциально может прогнозировать максимальную эффективность при использовании метформина у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2-го типа.

**Ключевые слова:** однонуклеотидный полиморфизм, сахарный диабет 2-го типа, метформин, эффективность.

A specific susceptibility to definite medicines is considered to be formed by genetic variations. Here we've tried to evaluate the implement of such gene variation as eNOS, hOGG1 and TP53 SNPs. There is no evidence of association between metformin effectiveness and these SNPs. We've showed the viable association of these SNPs haplotypes with metformin effectiveness in patients with newly diagnosed T2DM.

**Key words:** SNP, T2DM, metformin, effectiveness.

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то что пероральные сахароснижающие препараты (ПССП) используются более полувека, вопрос о фармакогенетике ПССП встал только в последние 5–6 лет. Было высказано предположение, что различные комбинации генома определяют индивидуальную восприимчивость к различным препаратам [1]. Для уточнения фармакогенетических аспектов метформина было проведено большое исследование (GWAS). Было показано, что за эффект метформина ответственна вариабельность генов SLC22A1, SLC47A1, ATM [2].

Более того, вскоре появились научные работы о том, что наличие определённого генотипа формирует и фенотипические особенности [3]. В то же время осуществляется поиск новых генов и их полиморфизмов, с которыми можно было бы связать и эффективность метформина, и наличие у препарата свойств, не связанных напрямую с сахароснижающим действием.

Очень заманчивым в этом отношении представляется изучение полиморфизмов гена, кодирующего эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS). Так, полиморфизм в промоторе 786T>C приводит к значительному сокращению количества самого фермента eNOS [4]. Изученными являются полиморфизм 4a/b интрона, полиморфизм G894T (Glu298Asp) 7-го экзона и полиморфизм C786T (rs 2070744) промотора гена eNOS [5]. Полиморфизм G894T имеет различное значение в зависимости от этнической принадлежности пациента (азиаты и европейцы) и неоднозначный характер, в то время как нет функциональных различий ОНП C786T для разных этнических групп. Тем не менее, в некоторых исследованиях была выявлена ассоциация генотипа гомозиготы по аллели Т с инсулинорезистентностью у пациентов с сахарным диабетом (СД) 2-го типа и кардиомиопатиями среди европейцев [6], японцев [7], с повышенным уровнем глюкозы в крови у жителей Саудовской Аравии [8], ретинопатией [9] и нефропатией [10].

Второй однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) гена, наличие которого потенциально способно изменить эффективность метформина, – это полиморфизм гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы – hOGG1 (Ser326Cys). Данный ОНП играет ключевую роль в устранении повреждений мтДНК вследствие митохондриального стресса, вызванного высоким содержанием свободных жирных кислот, что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию IRS-1 (субстрат-инсулинового рецептора-1), далее к фосфорилированию Akt2 (RAC-бета серин/треониновая протеинкиназа (продукт гена akt2)), что, в конечном счете, улучшает перемещение GLUT-4 на плазматическую мембрану и обеспечивает утилизацию глюкозы клетками [11].

В исследованиях была показана строгая ассоциация полиморфизма C977G (Ser326Cys), в частности аллеля G (Cys), с инсулинорезистентностью у пациентов с предиабетом [12], повышенными показателями ИМТ и уровнем глюкозы крови [13].

Третий полиморфизм – это изменчивость гена p53, а именно кодон 72 (Arg72Pro, rs1042522) связывают с инсулинорезистентностью и массой тела у пациентов с СД 2-го типа. Показано, что G-аллель (Arg) полиморфизма белка p53 (rs1042522) ассоциирована с более высоким риском СД 2-го типа у 55 521 европейца [14]. В другом исследовании выявлена ассоциация между полиморфизмом p53 и СД 2-го типа, но зависимости от аллелей не обнаружено. Обширное исследование, проведенное на более чем 2000 пациентов с 222 генами-кандидатами, которые увеличивают риск возникновения СД 2-го типа, показало, что полиморфизм гена TP53 является одним из трех генов-кандидатов с большой статистической значимостью [15].

**ЦЕЛЮ НАСТОЯЩЕГО ИССЛЕДОВАНИЯ** было оценить наличие данных ОНП у больных с впервые выявленным сахарным диабетом и выявить наличие наиболее оптимальных комбинаций, способных повысить эффективность действия метформина.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе эндокринологического отделения и отделения лабораторной диагностики ГБУЗ НО «НОКБ им. Н.А. Семашко», а также НИИ молекулярной биологии и региональной экологии НГУ им. Н.И. Лобачевского. Обследовано 169 человек, в том числе 89 пациентов с СД 2-го типа и 80 человек без СД. Оценивались показатели гликемии, гликированного гемоглобина, уровень С-пептида. Проводилось определение однонуклеотидных полиморфизмов трех генов – rs1042522 (белка p53), rs1052133 (8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы), rs2070744 (эндотелиальной синтазы NO).

ОНП гена синтазы окиси азота 3 eNOS3 (C786T) выявляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в реальном времени. ОНП 8-оксогуанин-ДНК-

гликозилазы hOGG1 Ser326Cys и ОНП p53 TP53 (Pro72Arg) определяли методом ПЦР в агарозном геле электрофорезом. Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: гомозигота по аллели 1; гетерозигота; гомозигота по аллели 2.

Все анализы были проведены с использованием диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР «SNP-ЭКСПРЕСС» производства НПФ «ЛИТЕХ» (Москва). С образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Использовали амплификатор детектирующий ДТ прайм по ТУ 9443-004-96301278-2010 в модификации 5М. Обработка данных проводилась при помощи пакета программ STATISTICA 10.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Генетическое исследование полиморфизмов трех генов (rs2070744, rs 1052133, rs1042522) показало, что частоты встречаемости гаплотипов среди пациентов с СД 2-го типа не отличаются от таковых среди лиц без нарушения углеводного обмена.

2. При проведении исследований выявлено, что у представителей гомозиготы по аллелю 2 (ТТ) ОНП гена эндотелиальной синтазы NO отмечен более высокий исходный уровень глюкозы плазмы натощак (ГПН), а у представителей гомозиготы по аллелю 1 (СС) – более низкий исходный уровень гликированного гемоглобина по сравнению с аналогичными показателями у двух других гаплотипов данного ОНП. В то же время исходный уровень С-пептида не отличается у представителей трех гаплотипов. В динамике трех месяцев наблюдения пациентов уровень гликированного гемоглобина и ГПН снижается статистически значимо во всех подгруппах обследованных.

Обращает на себя внимание то, что у представителей гомозиготы по аллелю 1 (СС) и гетерозиготы (СТ) происходит статистически более выраженное снижение уровня гликированного гемоглобина на 1,05% (p=0,011) и 0,85% (p=0,036) соответственно, при этом у представителей ТТ гаплотипа HbA1c составляет 0,37% за три месяца наблюдений.

У представителей гомозиготы по аллелю 2 (ТТ) уровень С-пептида значимо снижается на 10%, в то время как в подгруппах СС и СТ данный показатель статистически значимо возрастает на 22% и 35% соответственно относительно результатов первого обследования (таблица 1).

3. При исследовании ОНП гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы получены следующие результаты: исходные показатели гликемии у представителей двух подгрупп (гомозиготы по аллелю 1 и гетерозиготы) друг от друга статистически значимо не отличаются. Снижение показателей гликированного гемоглобина и уровня ГПН

**ТАБЛИЦА 1.**

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

Показатель	Гаплотип (частота)		
	СС (0,133)	СТ (0,284)	ТТ (0,583)
НbA1c до начала терапии, %	6,90 [6,70;7,30]# p=0,0347	7,70 [7,10;8,50]	7,40 [7,00;9,40]
НbA1c через три месяца терапии, %	5,80 [5,00;6,90]* p=0,035	6,95 [6,50;7,70]* p=0,0268	6,60 [6,30;7,60]* p=0,0265
ГПН до начала терапии, ммоль/л	7,70 [7,35;8,05]	7,90 [6,60;9,00]	8,05 [6,20;10,00]# p=0,0319
ГПН через три месяца терапии, ммоль/л	6,30 [6,00;7,40]* p=0,014	6,90 [6,50;8,00]* p=0,028	7,30 [5,40;8,60]* p=0,01
С-пептид до начала терапии, нг/мл	1,85 [1,20;2,20]	2,14 [1,48;2,80]	2,14 [1,60;3,14]
С-пептид через три месяца терапии, нг/мл	2,37 [2,05;2,70]* p=0,027	2,90 [1,98;3,20]* p=0,042	1,95 [1,04;2,65]* p=0,041

**Примечания:** НbA1c,% – гликированный гемоглобин, ГПН – глюкоза плазмы натощак, # – уровень статистической значимости различий между исходными показателями у представителей разных гаплотипов.

**ТАБЛИЦА 2.**

Динамика показателей гликемии при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1052133 (ОНП С977G гена 8-оксогоуанин-ДНК-гликозилазы) (Ме [25р; 75р])

Показатель	Гаплотип (частота)	
	СС (0,621)	СG (0,379)
НbA1c до начала терапии, %	7,30 [6,80;8,00]	7,60 [7,15;8,15]
НbA1c через три месяца терапии, %	6,90 [6,20;7,70]* p=0,014	6,85 [6,20;7,70]* p=0,013
ГПН до начала терапии, ммоль/л	8,00 [7,20;10,00]	8,60 [7,05;9,65]
ГПН через три месяца терапии, ммоль/л	7,20 [5,50;8,00]* p=0,006	7,15 [6,30;7,80]* p=0,004
С-пептид до начала терапии, нг/мл	2,05 [1,48;3,12]	2,14 [1,49;2,57]
С-пептид через три месяца терапии, нг/мл	1,95 [1,45;2,30]	2,50 [1,48;2,76]* p=0,0417

**Примечания:** НbA1c,% – гликированный гемоглобин, ГПН – глюкоза плазмы натощак, \* – уровень статистической значимости различий между показателями до и через три месяца терапии.

**ТАБЛИЦА 3.**

Динамика показателей гликемии при применении метформина в зависимости от гаплотипа rs 1042522 ОНП гена TP53 C215G (Pro72Arg) (Ме [25р; 75р])

Показатель	Гаплотип (частота)		
	СС (0,149)	СG (0,362)	GG (0,489)
НbA1c до начала терапии, %	7,10 [6,80;7,50]	7,10 [6,80;7,70]	7,45 [7,10;9,10]
НbA1c через три месяца терапии, %	6,30 [6,10;6,60]* p=0,022, **p=0,04	6,50 [6,05;7,35]* p=0,026	7,10 [6,10;7,80]* p=0,029
ГПН до начала терапии, ммоль/л	7,80 [6,10;8,80]	7,50 [6,20;9,00]	9,00 [7,60;10,00]
ГПН через три месяца терапии, ммоль/л	6,20 [4,50;7,10]* p=0,019	6,80 [5,20;7,40]* p=0,018	7,80 [6,30;9,50]* p=0,035
С-пептид до начала терапии, нг/мл	2,00 [1,90;2,70]	2,65 [2,05;3,49]	1,55 [1,20;2,94]
С-пептид через три месяца терапии, нг/мл	2,10 [1,90;2,34]	2,10 [1,00;2,40]	1,95 [1,65;2,63]* p=0,019

**Примечания:** НbA1c,% – гликированный гемоглобин, ГПН – глюкоза плазмы натощак, \* – уровень статистической значимости различий между показателями до и через три месяца терапии, \*\* – уровень статистической значимости различий в динамике показателей в подгруппах разных гаплотипов.

наблюдается как в группе гомозиготы (на 0,6% и 10% соответственно), так и гетерозигот (на 0,63% и 17% соответственно). При этом у гетерозигот отмечается значимое повышение уровня С-пептида относительно показателей первого обследования на 17% (таблица 2).

4. При исследовании ОНП гена белка р53 было показано, что исходные исследуемые показатели гликемии представителей всех трех подгрупп гаплотипов ОНП гена белка р53 (С215G Pro72Arg) статистически значимо не различаются. Динамика снижения относительно исходных показателей уровня гликогемоглобина и ГПН является значимой, а также и более существенной в подгруппе СС и составляет 0,95%, в то время как в подгруппе СG – 0,5%, в подгруппе GG – 0,029%. При этом снижение уровня ГПН у представителей гаплотипа СС составляет 21%, СG – 9% GG – 13,3%. Уровень С-пептида увеличивается в подгруппе GG на 26% относительно показателя первого обследования (таблица 3).

**ВЫВОДЫ**

Наличие определённых ОНП генов потенциально может прогнозировать максимальную эффективность при использовании метформина у больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2-го типа.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Pacanowski M.A., Hopley C.W., Aquilante C.L. Interindividual variability in oral antidiabetic drug disposition and response: the role of drug transporter polymorphisms. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008. May. № 4 (5). P. 529-544. doi: 10.1517/17425255.4.5.529
2. Becker M.L., Pearson E.R., Tkac I. Pharmacogenetics of oral antidiabetic Drugs. *International Journal of Endocrinology.* 2013. article ID 686315, 10 p. <http://dx.doi.org/10/1155/2013/686315>.
3. Christensen M.M. et al. A gene-gene interaction between polymorphisms in the OCT2 and MATE1 genes influences the renal clearance of metformin. *Pharmacogenet. Genomics.* 2013. Vol. 23 (10). P. 526-534.
4. Soubrier F. Nitric Oxide Synthase Genes: Candidate Genes Among Many Others. *Hypertension.* 1999. Vol. 33. P. 924-926.
5. Eynon N. The C allele in NOS3 -786 T/C polymorphism is associated with elite soccer player's status. *Int J Sports Med.* 2012. Vol. 33 (7). P. 521-524.
6. Matsa L.S. et al. Haplotypes of NOS3 gene polymorphisms in dilated cardiomyopathy. *PLoS One.* 2013. Vol. 8 (7): e70523. doi: 10.1371/journal.pone.0070523. Print 2013.
7. Nakayama M. et al. T-786 C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation.* 1999. Vol. 99. P. 2864-2870.
8. Alkharfy K.M., Al-Daghri N.M., Al-Attas O.S. et al. Variants of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with components of metabolic syndrome in an Arab population. *Endocr J.* 2012. Vol. 59 (3). P. 253-263.
9. Ezzidi I. et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and T-786C polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008. Vol. 68 (4). P. 542-546.
10. Ezzidi I. et al. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene variants with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2008. Vol. 22 (5). P. 331-338. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2007.11.011.
11. Yuzefovych L.V. et al. Alteration of mitochondrial function and insulin sensitivity in primary mouse skeletal muscle cells isolated from transgenic and knockout mice: role of OGG1. *Endocrinology.* 2013. Vol. 154 (8). P. 2640-2649. doi: 10.1210/en.2013-1076.

**12.** Chen H. et al. AluYb8 insertion in the MUTYH gene is related to increased 8-OHdG in ge-nomic DNA and could be a risk factor for type 2 diabetes in a Chinese population. Mol Cell Endocrinol. 2011. Vol. 332 (1-2). P. 301-305. doi: 10.1016/j.mce.2010.11.021.

**13.** Hara M., Nakamura K., Nanri H. et al. Associations between hOGG1 Ser326Cys polymorphism and increased body mass index and fasting glucose level in the Japanese general population. Journal of Epidemiology. 2014. Vol. 24 (5). P. 379-384.

**14.** Burgdorf K.S. Studies of the association of Arg72Pro of tumor suppressor protein p53 with type 2 diabetes in a combined analysis of 55,521 Europeans. PLoS One. 2011. Vol. 20. № 6: e15813. doi: 10.1371/journal.pone.0015813 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3024396/> (дата обращения 20.11.2013).

**15.** Gaulton K.J. et al. Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes. Diabetes. 2008. Vol. 57 (11) . P. 3136-3144. doi: 10.2337/db07-1731.