

ЧАСТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «РЕАВИЗ»

*На правах рукописи*

**ИСХАКОВА АЛЬФИЯ ГУМЯРОВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА  
ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ У ПАЦИЕНТОВ  
С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ВТОРОГО ТИПА**

3.3.3. Патологическая физиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент  
Павлова Ольга Николаевна

Саратов – 2023

**СОДЕРЖАНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОЛОГИИ, КЛАССИФИКАЦИИ И МЕХАНИЗМАХ ПАТОГЕНЕЗА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	11
1.1 Современные представления об этиологии и классификации диабетической ретинопатии.....	11
1.2 Механизмы патогенеза диабетической ретинопатии.....	15
1.2.1 Основные факторы роста сосудов и механизм их действия.....	20
1.2.2 Генетические факторы риска развития диабетической ретинопатии .....	24
1.2.2.1 Роль полиморфных маркеров гена AKR1B1, кодирующего альдозоредуктазу, в развитии диабетической ретинопатии.....	25
1.2.2.2 Роль полиморфных маркеров генов NOS, кодирующих NO-синтазы, в развитии диабетической ретинопатии.....	26
1.2.2.3 Роль полиморфных маркеров гена VEGF, кодирующего сосудистый эндотелиальный фактор роста, в развитии диабетической ретинопатии .....	27
1.2.2.4 Роль полиморфных маркеров гена ITGA2, кодирующего белок интегрин альфа-2, в развитии диабетической ретинопатии.....	28
1.2.2.5 Роль полиморфных маркеров гена ICAM1 в развитии диабетической ретинопатии .....	30
1.2.2.6 Роль полиморфных маркеров гена ADRB3 в развитии диабетической ретинопатии .....	31
1.2.2.7 Роль полиморфных маркеров гена APOE, кодирующего сосудистый аполипопротеин E, в развитии диабетической ретинопатии.....	32

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	35
2.1 Формирование выборки и методология исследования .....	35
2.2 Клиническая характеристика пациентов .....	38
2.3 Общеклинические методы исследования .....	42
2.4 Молекулярно-генетические методы исследования .....	45
2.5 Статистическая обработка результатов .....	51
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	52
3.1 Характеристика пациентов по факторам риска развития диабетической ретинопатии.....	52
3.1.1 Анализ у пациентов частот мутаций генов, ассоциированных с диабетической ретинопатией.....	63
3.2 Межгенные взаимодействия как фактор развития диабетической ретинопатии.....	76
3.3 Результаты когортного исследования пациентов с диабетической ретинопатией .....	87
3.4 Результаты когортного исследования пациентов без диабетической ретинопатии .....	94
ВЫВОДЫ .....	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Одной из причин инвалидизации среди офтальмологических заболеваний в последние десятилетия становится диабетическая ретинопатия. Диабетическая ретинопатия – это специфическое позднее осложнение сахарного диабета, связанное с поражением сосудов сетчатой оболочки глаза, выступающее причиной инвалидности по зрению у пациентов в 80–90 % случаев.

По данным Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, представляющая наибольшую угрозу зрению пролиферативная диабетическая ретинопатия присутствует у 50 % пациентов с длительностью сахарного диабета 1-го типа 20 лет и более. При сахарном диабете 2-го типа, составляющем 90–95 % всех случаев этого заболевания, в связи с поздней диагностикой признаки диабетической ретинопатии выявляются в момент установления диагноза «сахарный диабет» в 15–30 % случаев, через 10 лет – в 50–60 %, а через 30 лет – более чем у 90 % больных [11, 18, 20].

Длительность диабета и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии ретинопатии. Однако эти факторы сами по себе не объясняют возникновение сосудистых осложнений. Кроме того, у ряда пациентов с плохим гликемическим контролем даже за длительный период диабета ретинопатия не развивается, в то время как у некоторых пациентов с хорошим гликемическим контролем ретинопатия развивается уже в течение нескольких лет. Соответственно можно предположить наличие влияния генетических факторов в развитии диабетической ретинопатии [118]. В этом аспекте изучение генетических маркеров диабетической ретинопатии имеет особую значимость в плане прогнозирования патологии и выделения групп риска на доклиническом этапе, когда профилактические меры имеют высокую эффективность действия.

## **Степень разработанности проблемы**

Актуальные на данный момент методы исследования генетической предрасположенности основаны на изучении полиморфных маркеров генов-кандидатов, продукты экспрессии которых участвуют в формировании определенных патологий. Ретинопатия, как многофакторная патология, имеет полигенный характер и требует оценки комплексной генетической панели. Так по мнению отечественных и зарубежных авторов, полиморфизмы гена AKR1B1 ((A-C)<sub>n</sub> и rs759853), кодирующего альдозоредуктазу, и гена VEGF (rs2010963), кодирующего фактор роста эндотелия сосудов, являются наиболее значимыми наследственными факторами, предрасполагающими к развитию диабетической ретинопатии среди всех описанных генов. Также описаны три полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3): rs1799983, rs41322052 и rs3138808 [93, 112, 143]. Наиболее изученным является полиморфизм rs3138808. Полиморфизм гена ACE, впервые описанный Rigat и соавт. [98], представляющий собой вставку (I) или удаление 287 bp последовательности в 16 интроне также ассоциирован с развитием диабетической ретинопатии. Массовых исследований генетических маркеров, связанных с ретинопатией ранее не проводилось.

## **Цель и задачи исследования**

Цель: исследовать роль молекулярно-генетических факторов в патогенезе диабетической ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и повысить эффективность диагностики и лечения данной патологии.

Для реализации цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ классических метаболических и офтальмологических факторов и генетических маркеров развития патологии глаз в группах пациентов с сахарным диабетом 2-го типа с наличием и отсутствием ретинопатии.

2. Изучить распределение аллелей и генотипов комплекса полиморфных маркеров генов-кандидатов развития ретинопатии: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), AKR1B1, ADRB3, ITGA2, APOE в группах пациентов с

сахарным диабетом 2-го типа и определить наличие ассоциации полиморфных маркеров данных генов-кандидатов с риском развития диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2-го типа.

3. Оценить взаимосвязи генетических полиморфизмов генов-кандидатов, ассоциированных с диабетической ретинопатией и вариантов клинического течения заболевания.

4. Разработать диагностическую модель информативных генетических маркеров для прогнозирования развития диабетической ретинопатии, включающую функциональную, офтальмологическую и эндокринологическую диагностику, и определения тактики ведения пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

### **Научная новизна результатов исследования**

Впервые изучена роль генетических факторов в развитии ретинопатии при сахарном диабете 2-го типа на основе полигенного молекулярно-генетического исследования потенциальных генов-кандидатов: VEGF, AKR1B1, ADRB3, ITGA2, APOE. Впервые разработана диагностическая панель информативных генетических маркеров для прогнозирования риска развития диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2-го типа. Впервые разработана программа-калькулятор (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» № 2022614737), позволяющая прогнозировать у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа развитие и течение диабетической ретинопатии. На основе использования программы врач-офтальмолог может разрабатывать наиболее эффективные тактики ведения пациентов исходя из их индивидуальных офтальмологических, эндокринологических и молекулярно-генетических показателей.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Установлено, что полиморфные локусы генов VEGF rs2010963, AKR1B1 rs759853, ITGA2 rs2910964, ADRB3 rs4994, APOE rs7412, APOE 429358, рассматриваемые независимо друг от друга, не связаны с развитием диабетической ретинопатии. Но при анализе взаимосвязей двух генов установлено, что при сочетании у пациентов гомозиготы по более редкому варианту гена AKR1B1 с гетерозиготой по редкому варианту гена VEGF или гомозиготой гена VEGF наблюдается наличие диабетической ретинопатии. При оценке взаимосвязей трех генов установлено, что ряд сочетаний генотипов определяют 100 % развития диабетической ретинопатии: сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3; сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2; сочетание гомозиготы по редкому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы; сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гомозиготой по редкому типу гена AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3; сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4; сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы; сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4.

Дальнейшие исследования в данной области позволят разработать эффективные варианты профилактики и лечения диабетической ретинопатии на основе комплексного подхода к болезни, которая имеет первостепенное значение и становится все более возрастающей проблемой общественного здравоохранения.

Комплексный персонализированный подход, включающий функциональную, офтальмологическую и эндокринологическую диагностику (в том числе исследование крови на гликированный гемоглобин, глюкозу, триглицериды и холестерин), повышает эффективность прогноза развития диабетической ретинопатии за счет научно обоснованного расчета с помощью разработанной

программы-калькулятора степени риска на основании широкого спектра клинически значимых показателей, влияющих на развитие, либо сопровождающих микрососудистые поражения сетчатки, что, в свою очередь, обеспечит возможность оказания своевременных профилактических мероприятий. Внедрение в схему диагностики диабетической ретинопатии молекулярно-генетического тестирования пациентов предоставит возможность выявлять наследственные маркеры предрасположенности к развитию диабетической ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и определять тактику их лечения.

Вышеперечисленные причины обуславливают научный и практический интерес к повышению эффективности прогноза развития диабетической ретинопатии на основе комплексного персонализированного подхода, включающего систему генетического скрининга, функциональные исследования сетчатки и эндокринологическую диагностику у больных сахарным диабетом.

### **Методология и методы исследования**

Для достижения цели и решения поставленных задач проведено офтальмологическое, эндокринологическое и молекулярно-генетическое исследование 475 пациентов с диагнозом «сахарный диабет 2-го типа». Базисом для разработки дизайна исследования был анализ современной литературы, имеющихся методологических подходов к реализации поставленных задач, а также гипотеза об ассоциации полиморфных маркеров генов-кандидатов (VEGF, AKR1B1, ADRB3, ITGA2, APOE) с риском развития диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2-го типа.

В работе применяли следующие методы исследования: общеклиническое обследование (офтальмологический осмотр и анализ биохимических показателей крови), позволяющие характеризовать основные клинические факторы развития осложнений при сахарном диабете 2-го типа и специальные – амплификация полиморфных участков исследуемых генов при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим изучением различий в частотах распределения отдельных аллелей/генотипов исследуемых полиморфных маркеров у лиц с



наличием и отсутствием диабетической ретинопатии. Полиморфные маркеры определяли электрофорезом на гелях и в режиме реального времени, Realtime ПЦР.

Клинические исследования проводились на базе ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского». Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и анализ полиморфных участков маркеров генов осуществлялись на базе ООО «ТестГен» (г. Ульяновск).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Особенности распределения аллелей и генотипов комплекса полиморфных маркеров генов-кандидатов развития ретинопатии: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), AKR1B1, ADRB3, ITGA2, APOE в группах пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

2. Диагностическая модель информативных генетических маркеров для прогнозирования развития диабетической ретинопатии.

3. Программа «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» – основа прогнозирования течения диабетической ретинопатии и тактики ведения пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

Степень достоверности и апробация результатов научных исследований

Клинические исследования проводились на базе Научно-исследовательского института глазных болезней Самарского государственного медицинского университета (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, СамГМУ). Выделение ДНК и анализ полиморфных маркеров генов осуществлялись на базе ООО «ТестГен» (г. Ульяновск) (договор о научно-техническом сотрудничестве и конфиденциальности № 241 от 19 января 2015 г).

Статистический анализ данных выполняли в среде пакета IBM SPSS 21. Для сравнения количественных признаков применяли критерий Манна-Уитни-Вилкоксона. Для сопоставления частот генотипов с наличием диабетической

ретинопатии применяли критерий хи-квадрат Пирсона ( $\chi^2$ ) и рассчитывали отношение шансов (ОШ) и его 95 % доверительный интервал (95 % ДИ). Для разработки прогностической модели риска развития ретинопатии применяли множественную логистическую регрессию. Качество прогнозирования оценивали с помощью ROC-кривых.

Для выделения мультилокусных генотипов применяли метод MDR (multifactor dimensionality reduction), реализованный в программном продукте MDR software (version 3.0.2).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 4 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в журнале, индексируемом медицинской базой данных Scopus, 1 статья в журнале, индексируемом в базе данных Web of Science, 1 патент, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиография включает 191 источник литературы (из них 91 отечественные и 100 зарубежные). Работа иллюстрирована 39 таблицами и 29 рисунками.

## ГЛАВА 1

# СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ЭТИОЛОГИИ, КЛАССИФИКАЦИИ И МЕХАНИЗМАХ ПАТОГЕНЕЗА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

### 1.1 Современные представления об этиологии и классификации диабетической ретинопатии

Диабет – это совокупность эндокринных заболеваний, объединенных нарушением процесса усвоения глюкозы и, соответственно, нарушением всех обменных процессов в организме. Начальные стадии диабета могут протекать скрытно, не имея ярко выраженных патологических признаков, поэтому заболевание обнаруживается на поздних стадиях развития и уже сопровождается многочисленными системными осложнениями [4, 25, 54].

По данным статистических исследований, в настоящее время количество больных, страдающих сахарным диабетом (СД), составляет более 130 миллионов человек и продолжает расти. Согласно Всемирной организации здравоохранения к 2025 году количество больных может увеличиться до 350 миллионов [5, 20].

Диабет характеризуется множественными осложнениями: микро- и макроангиопатия, нефропатия, нейропатия, ретинопатия.

Так как на качество жизни пациента особо влияет функционирование органов зрения, подробнее рассмотрим проблему диабетической ретинопатии.

Диабетическая ретинопатия – это специфическое позднее осложнение сахарного диабета, связанное с поражением сосудов сетчатой оболочки глаза, выступающее причиной инвалидности по зрению у пациентов в 80–90 % случаев.

Диабетическая ретинопатия (ДР) и макулярный отек (МО) являются наиболее частыми причинами нарушения зрения у пациентов в возрасте 20–74 лет и рассматриваются в качестве основных причин слепоты у людей с СД [20, 40, 53].

По данным Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, диабетическая ретинопатия в пролиферативной стадии присутствует у 50 % пациентов с длительностью СД 1-го типа более 20 лет, а при СД 2-го типа, в связи с поздней диагностикой, признаки ДР выявляют в момент установления диагноза СД в 15–30 % случаев, через 10 лет – в 50–60 %, а через 30 лет – более чем у 90 % больных [35, 40, 156, 191].

Согласно Всемирной организации здравоохранения, ДР является основной причиной слепоты у трудоспособного населения развитых стран и входит в число главных причин снижения зрения в возрасте 65 лет и старше. Установлено, что чем больше «стаж» СД, тем выше шансы на развитие диабетической ретинопатии. В среднем патологические изменения сетчатки выявляются примерно у 80 % пациентов, страдающих СД в течение 10 и более лет [17, 18, 40, 74, 86].

Следует также учитывать значительные расхождения между фактической и регистрируемой распространенностью как СД, так и ДР [23, 24].

Риск возникновения отека макулы выше у пациентов с СД 2-го типа. С увеличением тяжести ДР частота МО возрастает, достигая 70 % при пролиферативной стадии данного осложнения [9, 74, 85, 144].

В патогенетическом лечении ДР основными факторами, на которые необходимо оказать влияние, являются гипоксия, ацидоз и венозный застой.

В настоящее время различают несколько форм ДР.

Непролиферативная ДР (НПДР) – первая стадия ДР, которая характеризуется окклюзией и повышенной проницаемостью мелких сосудов сетчатки (микрососудистая ангиопатия). Для этой стадии характерно многолетнее течение при полном отсутствии нарушения зрения.

Пролиферативная ДР (ПДР) развивается на фоне непролиферативной ДР, когда окклюзия капилляров ввиду уменьшения количества опорных клеток перicyтов, имеющих свойство гладкомышечных клеток, приводит к возникновению обширных зон ишемии с формированием микроаневризм и к нарушениям кровоснабжения сетчатки. Пролиферативные изменения сетчатки

могут выражаться в двух вариантах: первый – формирование новообразованных сосудов; второй – разрастание соединительной ткани [94].

Обычно пролиферативная ДР начинается с неоваскуляризации, за которой в дальнейшем может последовать формирование фиброзных разрастаний. Новообразованные сосуды могут расти над поверхностью ретины как горизонтально, так и вертикально – в сторону стекловидного тела. В последнем случае они могут вызвать отслоение задней гиалоидной мембраны стекловидного тела, либо прорываются внутрь его, создавая риск кровоизлияний. Офтальмоскопически преретинальная неоваскуляризация видна как хаотичное или сетевидное разрастание тонких сосудов, анастомозирующих друг с другом. Она определяется гораздо раньше при проведении флуоресцентной ангиографии (ФАГ). Характерными свойствами новообразованных сосудов являются их патологическая проницаемость, что на ФАГ наглядно проявляется в ее начальных фазах [20, 23, 24, 30, 91, 125].

Формирующаяся при пролиферативной стадии соединительная ткань распространяется по поверхности задней гиалоидной мембраны стекловидного тела, вызывая в дальнейшем ее частичную отслойку. Преретинальная неоваскуляризация может сформироваться в любом отделе глазного дна, но чаще она развивается по ходу ретинальных сосудов. Патогенез ее формирования заключается в выработке биохимических неоваскулярных факторов (представленных простагландинами и факторами роста сосудов) неперфузируемой ишемической зоной сетчатки. Считается, что вазопротрофирующий фактор оказывает действие лишь тогда, когда его количество достигает определенной критической величины. Существует также гипотеза выработки неоваскулярного фактора, заключающаяся в том, что толщина аваскулярно развивающейся сетчатки онтогенетически строго обусловлена. При ее утолщении (характерном для ДР тромбозе центральной вены сетчатки) ее снабжение кислородом лишь из хориокапилляров становится недостаточным, и «включается» пусковой механизм неоваскуляризации сетчатки. Непосредственно область макулы, как правило, не затрагивается неоваскуляризацией. Это обусловлено особенностями архитектоники сосудистого русла в данном отделе – плотность хориокапиллярного

слоя сосудистой оболочки под макулой настолько велика, что она в любых условиях продолжает снабжать эту область сетчатки кислородом. Именно поэтому область макулы не покрывается и пролиферативной тканью.

Полная потеря зрения чаще всего связана с развитием пролиферативного процесса, происходящего почти бессимптомно для пациента, что приводит к значительному снижению зрения, которое на поздних стадиях развития заболевания необратимо [5, 10, 15, 26].

Диабетическая макулопатия по характеру течения подразделяется на экссудативную, ишемическую и тракционную формы.

Экссудативная форма – встречается наиболее часто: формируются кольца «твердых» экссудатов, которые постепенно увеличиваются в сторону фовеолы. В целом твердые экссудаты – это отложения липидов, липопротеинов в сетчатке вследствие их протекания из сосудистой стенки. Они чаще проникают из ретинальных микроаневризм и капилляров. Высказано также предположение, что «твердые» экссудаты – продукт дегенерации клеток Мюллера, содержащих желтый пигмент.

Ишемическая макулопатия – наихудший прогноз в отношении центрального зрения. Встречается гораздо реже, чем экссудативный МО. Характерным ее признаком является отсутствие перфузии перифовеолярной зоны. На ФАГ перифовеолярные капилляры выглядят как бы обрубленными, их терминальная часть расширена.

Тракционный МО, как правило, возникает при посттравматических и воспалительных поражениях сетчатки, формируются витреоретинальные сращения в результате разрастания и сокращения фиброзной ткани. Вследствие этого стекловидное тело оказывает тракционное (тянущее) воздействие на сетчатку, таким образом вызывая отек макулы, а иногда и отслоение или разрыв сетчатки [27, 36, 95, 96].

## 1.2 Механизмы патогенеза диабетической ретинопатии

Механизмы развития МО и ДР многообразны и в настоящее время изучены далеко не полностью, но в качестве ведущих путей развития рассматриваются повреждения белков, которые обладают каталитическими и регуляторными функциями. Основной патогенетический механизм, приводящий к повреждению эндотелия сосудов при СД, – хроническая гипергликемия, приводящая к активации альдозоредуктазы, интенсификации неферментативного гликозилирования белков, нарушению миоинозитол фосфатидилинозитолового механизма, повышению активности протеинкиназы С, активации полиолового пути окисления глюкозы с образованием высоко осмотических соединений, активации конечных продуктов усиленного гликозилирования, усилению перекисного окисления липидов и, как следствие, накоплению свободных радикалов, что способствует нарушению целостности клеточных мембран и повышению проницаемости сосудистой стенки [97, 116, 122, 148, 151]. Однако поражение тканей на биохимическом уровне также может быть вызвано некаталитическим гликированием белков и гипоксией. Также при развитии диабетического МО пусковую роль играет не только хроническая гипергликемия, но и нарушение функций гематоофтальмического барьера [3, 16].

При избытке внутриклеточной глюкозы ее расщепление идет по полиоловому пути, и в клетках пигментного эпителия, эндотелия сосудов и периваскулярных ретинальных астроцитах накапливаются продукты обмена – сорбитол и фруктоза, провоцируя осмотический отек клеток, в конечном итоге ведущий к их полному разрушению. В конечной стадии процесса в слое Генле и внутреннем ядерном слое сетчатки накапливается внеклеточная жидкость [18, 121, 150].

Некаталитическое (неферментное) гликирование белков является модификацией белковых молекул за счет их связывания с глюкозой без участия ферментов, что приводит к каскаду биохимических реакций с образованием структур, называемых конечными продуктами гликирования (КПГ).

На первой стадии гликозилирования образуется соединение глюкозы с белком с формированием альмидина или N-гликозиламина. Данное соединение весьма лабильное и может распадаться. Для его образования достаточно нескольких часов. Если уровень гликемии остается высоким, образуется субстанция Амадори или 1-амино-1-деоксикетоза. Данное соединение является стабильным и затем окисляется до реактивных дикарбонильных интермедиатов (РДИ): 3-деоксиглюкозон и метилглиоксаль.

Последней ступенью окисления РДИ является появление КПГ. Нужно отметить, что РДИ также могут инактивироваться специфическими ферментами класса редуктаз, что является наиболее предпочтительным путем для метаболизма в организме. Для преимущественной активации данного пути используется тиоктовая ( $\alpha$ -липоевая) кислота, что выражается в уменьшении количества РДИ, повышении активности редуктазы, снижении скорости образования КПГ, а, следовательно, ведет к замедлению прогрессирования сосудистых осложнений диабета [34].

По данным исследований, КПГ могут образовываться и коротким путем – за счет металкатализируемого аутоокисления различных сахаров их превращения в РДИ [34, 58]. До недавнего времени глюкоза считалась практически единственным сырьем для образования КПГ, однако путем иммунохимических исследований с помощью меченных аутоантител установили наличие в составе КПГ различных сахаров [61, 163].

Установлено, что накопление КПГ в организме приводит к различным метаболическим изменениям, среди которых нарушение формирования, пространственной укладки и обновления белковых молекул, утолщение базальных мембран, увеличение ригидности тканей в связи с появлением перекрестных сшивок между белками. Также на поверхности клеток имеются специфические рецепторы к КПГ, что обуславливает возможность их накопления в тканях и способность вызывать множественные структурные изменения. Взаимодействие КПГ с рецепторами макрофагов активирует синтез



цитокинов, в том числе интерлейкина-1, способствующего пролиферации клеток стенок сосудов и матрикса [45, 66, 76, 134].

Также установлено, что гликирование снижает активность ингибиторов протеаз, ферментов, отвечающих за антиоксидантную защиту. При взаимодействии с рецепторами эндотелиоцитов КПП индуцируют ускоренный синтез эндотелина, одновременно ингибируя образование простаглицлина, а в тромбоцитах стимулируется синтез тромбосана. Соотношение простаглицлин/тромбосаны смещается в сторону увеличения последних, что дополнительно стимулирует агрегацию тромбоцитов, и развивается синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания [75, 81, 132].

Возрастает также количество гликогемоглобина, а его гликозилирование влияет на сродство к кислороду и считается одним из главных механизмов гипоксического состояния ткани при диабете. На сегодняшний день накоплено немало доказательств вклада неферментного гликирования белковых молекул в формировании и прогрессировании микрососудистых осложнений при сахарном диабете [89, 90, 162].

Нарушения, связанные с повышением концентрации глюкозы в крови и тканях, приводят к изменениям, похожим на гипоксические. На ранних стадиях патологического процесса происходит нарастание кровотока в результате активации синтеза оксида азота (NO), мощного вазодилататора. Затем, при возникновении глубоких структурных изменений происходит как угнетение синтеза NO, так и снижение чувствительности к нему, что сопровождается повышенной продукцией эндотелина и способствует дальнейшей вазоконстрикции [1, 11, 43].

Также дополнительным компонентом патогенеза сосудистых изменений при СД является дислипидемия. Существует прямая зависимость между степенью нарушения липидного обмена и стадией ДР [38, 44, 165].

Усиление кровотока, а также выше перечисленные патологические процессы у больных с некомпенсированным СД приводят к повреждению эндотелиоцитов и нарастанию оксидативного стресса [155, 158, 164, 169].

При этом пусковым механизмом нарушений, приводящих к различным осложнениям диабета, является не только повышенный уровень глюкозы, но и другие метаболиты [49, 51, 52].

Свободные радикалы являются продуктами нормального метаболизма и обладают окислительной активностью. Установлено, что при различных патологических процессах, в частности при СД, их уровень повышается до высоких концентраций, что способствует повышению в организме уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в целом и, в частности, денатурации белков. В свою очередь ПОЛ приводит к нарушениям метаболизма арахидоновой кислоты, что выражается в усилении агрегации тромбоцитов [1, 2, 37, 171, 174].

Дыхательная цепь митохондрий является одним из мест повышенной продукции активных форм кислорода. Основная часть кислорода, образующегося в митохондриях, используется для последующего синтеза аденозинтрифосфата (АТФ). Установлено, что в норме примерно 1–2 % активного кислорода расходуется на синтез свободных радикалов, но у пациентов с СД это количество значительно больше.

Таким образом высокая концентрация активных форм кислорода (в частности – супероксид-аниона) приводит к нарушению синтеза оксида азота, выполняющего вазодилатирующую и антиатерогенную функции. В результате соединения супероксид-аниона с NO, образуется мощный оксидант – пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), что приводит к потере оксидом азота своей биологической активности и антипролиферативных свойств [59, 60, 172].

Выявлено также повреждающее действие пероксинитрита на ДНК [62].

На фоне СД обнаруживается дисгенез митохондрий: появляются митохондрии с низкой массой, дисфункциональные митохондрии, нарушается аутофагоцитоз. Последние научные исследования подтверждают тесную связь между дисфункцией эндотелиоцитов, митохондриальным дисгенезом и гиперпродукцией свободных радикалов у пациентов с СД [70, 76, 176].

Патологические изменения в эндотелии сосудов, снижение деформационной способности эритроцитов, активация агрегации тромбоцитов и

прокоагуляционных факторов (например, повышение активности фибриногена) приводят к окклюзии капилляров [77, 78].

Исходя из вышесказанного становится очевидным, что капиллярная окклюзия вторична по отношению к повреждению стенок капилляров (увеличение толщины базальной мембраны, снижение численности перицитов, изменения в эндотелиоцитах) и/или изменениям реологии циркулирующей крови. Клинически значимая окклюзия капилляров микроциркуляторного русла сетчатки приводит к ее ишемии [83, 88].

В настоящее время доказана важная роль стекловидного тела в возникновении МО. Изменяя свое анатомическое строение, задняя гиалоидная мембрана препятствует физиологическому метаболизму сетчатки, тем самым вызывает и поддерживает отек макулы [40, 48, 168].

Важным условием нормального функционирования сетчатки является полноценность гематоретинальных (наружного и внутреннего) барьеров. Под наружным гематоретинальным барьером подразумевают пигментный эпителий, так как наружные слои сетчатки питает хориоидея. Внутренний гематоретинальный барьер формируют стенки капилляров сетчатки, расположенных во внутреннем плексиформном слое. Данный барьер регулирует обмен веществ между кровью и клетками сетчатки, оберегает сетчатку от избыточной гидратации и поддерживает ее прозрачность. Прорыв барьера возможен при гибели эндотелиальных клеток, разрыве межклеточных контактов, нарушении целостности базальной мембраны, что приводит к ряду метаболических нарушений и отеку сетчатки [5, 19].

Нарушение внутреннего гематоретинального барьера вторично относительно анатомических повреждений эндотелиоцитов капилляров, которые, в свою очередь, связаны с разрушением системы межклеточных контактов, локальной гипоксией сетчатки, осмотическим стрессом.

В последние годы особую роль в возникновении МО приписывают различным факторам роста, способным активировать ангиогенез и, тем самым, приводить к развитию классических патологических изменений развитой ДР и МО.

### 1.2.1 Основные факторы роста сосудов и механизм их действия

Среди известных факторов роста сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) является одним из наиболее значимых медиаторов повышенной проницаемости ретинальных сосудов [23, 35, 42, 99, 115], который также способствует ретинальной и хориоидальной неоваскуляризации [46, 48, 121, 154, 173].

VEGF был выделен в 1983 году как агент, увеличивающий проницаемость сосудов в тканях опухолей. Данный фактор относится к семейству гомодимерных гликопротеинов, по строению похож на фактор роста тромбоцитов и имеет афинность к пяти типам рецепторов, реализующих свое действие через тирозин-киназную систему. VEGF ответственен за ряд как физиологических, так и патологических процессов, например: эмбриогенез, регенеративные процессы, иммунный ответ, канцерогенез [50, 100].

VEGF является эссенциальным фактором при формировании сосудов в эмбриональном и раннем постнатальном периодах. Формирование почечных клубочков и работа гломерулярного фильтра осуществляются под ген-зависимым контролем VEGF. Он также принимает участие в регенерации миоцитов, ремоделировании миокарда, эндохондральном костеобразовании, мобилизует эндотелиальные клетки костного мозга, действуя как хемоаттрактант. У взрослых действие VEGF на сосудистую стенку является многоуровневым и многообразным: он приводит к дилатации сосудов, усиливает их проницаемость, обеспечивает выживание эндотелиоцитов [8, 10, 50].

Повышенный синтез VEGF способствует избирательному уменьшению содержания специфических белков окклюдина, кадгерина-5 и ZO-1, которые служат молекулярным субстратом плотных межэндотелиальных соединений и отвечают за регуляцию проницаемости гематоретинального барьера, а другие факторы проницаемости сосудов действуют опосредовано через VEGF [47, 167].

Ключевым фактором ангиогенеза в норме и патологии принято считать именно VEGF [12, 72]. В норме этот ростовой фактор поддерживает жизнеспособность сетчатки, обладает прямым антиапоптотическим действием на

фоторецепторы, клетки Мюллера и ганглионарные клетки сетчатки. Он секретируется эндотелиальными клетками сосудов, астроцитами, клетками пигментного эпителия сетчатки и ганглиозными клетками и оказывает свои физиологические эффекты путем изменения проницаемости сосудов, ангиогенеза, пролиферации и миграции эндотелиальных клеток [87, 92].

Семейство VEGF у человека включает факторы VEGF-A, -B, -C, -D, а также плацентарный фактор роста (PlGF). У больных СД с различной выраженностью ангиопатий зафиксировано повышение уровня VEGF-A в плазме крови и в моче [107, 109, 157].

Действуя ауто- и паракринным путем, VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток и их предшественников, увеличивает сосудистую проницаемость, способствует вазодилатации через усиление продукции оксида азота (NO). В последние годы показано, что VEGF обеспечивает выживание и структурную целостность ретинального пигментного эпителия [128], оказывает антинейродегенеративный эффект и препятствует апоптозу ретинальных клеток в условиях ишемии-реперфузии [167, 173].

В норме VEGF присутствует в конъюнктиве, сетчатке и хориоидее [72, 73]. В сетчатке человека VEGF обнаружен в следующих слоях: в стенке сосудов, в слое ганглионарных клеток и по ходу их островков, в клетках внутреннего ядерного слоя (особенно в дистальной его части), в синаптических терминалях фоторецепторов и наружном плексиформном слое и в дистальной части по отношению к наружной пограничной мембране фоторецепторов, в базальной части пигментного эпителия сетчатки [80]. VEGF регулирует развитие и рост новых сосудов в сетчатке.

Ангиогенез обязательно включает миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Локальное расширение сосуда в ответ на повышение уровня NO приводит к увеличению проницаемости сосудистого эндотелия и выходу из сосудистого русла белков плазмы крови. Ангиогенные факторы (VEGF-A) из очага воспаления действуют на эндотелий, приводя к обособлению так называемых «концевых» клеток, которые секретируют протеолитические

ферменты, разрушающие окружающий матрикс и ангиопоэтин 2, который ингибирует рецептор Tie2, что приводит к ослаблению межклеточных контактов [8, 109]. В результате «концевые» клетки направленно мигрируют в зону воспаления по градиенту VEGF и других факторов. За ними следуют эндотелиальные клетки, которые создают ствол образующегося капилляра [117, 160]. Матриксные протеиназы и активаторы плазминогена играют важную роль в деградации внеклеточного матрикса, освобождении связанных с ним цитокинов и активации миграции клеток. В частности, урокиназа участвует в активации локального протеолиза. Взаимодействуя с рецептором на поверхности эндотелиальных клеток, урокиназа стимулирует их миграцию и образование капилляроподобных структур. Связывание урокиназы с рецептором приводит к активации внутриклеточных сигнальных систем независимо от протеолитической активности урокиназы [67]. Аналогичным образом урокиназа стимулирует миграцию гладкомышечных клеток [67], которые образуют внутренний слой стенки будущего сосуда. Вместе с перицитами эти клетки обеспечивают стабилизацию и созревание сосуда. В регуляции активности этих клеток важную роль играют тромбоцитарный (PDGF-BB) и трансформирующий (TGF $\beta$ ) факторы роста [75, 80]. Наконец, при участии тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (TIMP) и ингибиторов активации плазминогена (PAI) эндотелиальные клетки формируют базальную мембрану образующегося сосуда.

Васкулогенез, в отличие от ангиогенеза, представляет собой процесс формирования кровеносных сосудов из прогениторных эндотелиальных клеток; он вносит существенный вклад в формирование новых сосудов и тесно связан с ангиогенезом [46]. Источником эндотелиальных клеток-предшественников считается костный мозг, из которого они рекрутируются в кровотоки под влиянием факторов роста и цитокинов, образующихся в зоне ишемии и воспаления [46, 64]. Направленная миграция циркулирующих эндотелиальных предшественников является важным этапом в формировании новых сосудов в зоне повреждения [8, 32, 89].

Таким образом, при неоваскуляризации новообразованные сосуды берут начало от уже существующих сосудов, растут к месту ишемии, где замещают поврежденные сосуды. При ретинальной неоваскуляризации новообразованные сосуды вначале разрастаются в слоях сетчатки, но затем они начинают прорастать в стекловидное тело. В результате уменьшения числа перицитов – клеток, окружающих эндотелий ретинальной сосудистой системы и обеспечивающих поддержание ее структуры и функционирования, увеличивается ломкость сосудов и сосудистой системы, что, в свою очередь, приводит к образованию просачиваний и кровоизлияний [8, 46], вызывая дегенерацию стекловидного тела, фиброзирование, образование тракций и, как результат, отслойку сетчатки. Таким образом, чаще всего новообразованные сосуды являются причиной гемофтальма, а в последующем – тракционной отслойки сетчатки [46].

МО может снизить зрительные функции как путем механических повреждений слоев сетчатки, отвечающих за остроту зрения, так и путем функционального сокращения числа фоторецепторов и иных структур, обеспечивающих зрительные функции [25, 48].

Наряду с VEGF-A, PlGF также является инструментом, способствующим увеличению проницаемости сосудов [119, 156, 157]. Существуют две изоформы PlGF: -1 и -2, различающиеся наличием у PlGF-2 гепаринсвязывающегося домена. PlGF обеспечивает пролиферацию вневорсинчатого трофобласта. PlGF был впервые идентифицирован при нормальных условиях в человеческой плаценте, но он также экспрессируется и в других тканях, таких как капилляры и эндотелий пупочной вены, костный мозг, матка, НК-клетки и кератиноциты. Существует мнение, что PlGF также участвует в патологическом ангиогенезе [156, 157]. Активность PlGF может проявляться при прямом взаимодействии фактора с VEGFR1. PlGF может синергично усиливать VEGF-индуцированный ангиогенез и проницаемость сосудов. Совместно с VEGF, PlGF индуцирует развитие сосудистых аномалий и изменений сетчатки, происходящих на ранних стадиях ДР: разрыв плотных межклеточных контактов, разрушение гематоретинального барьера, субретинальное скопление жидкости [9, 10, 47].

PlGF обнаруживает в 42–46 % гомологию с VEGF-A, а также обладает теми же топологическими свойствами. Примечательно, что PlGF и VEGF-A одинаково связываются с рецептором VEGF-R1, причем PlGF демонстрирует более высокую аффинность к рецептору по сравнению с VEGF-A (PlGF не способен связываться с VEGF-R2) [10, 47, 72].

При повышенных уровнях PlGF, а равно и VEGF-A, через VEGF-R1 стимулируется миграция моноцитов/макрофагов костного мозга к очагам воспаления, значительно ускоряя патологический ангиогенез [47, 72].

Выяснение ведущей роли VEGF в развитии ретиальной неоваскуляризации послужило обоснованием попыток применения анти-VEGF-препаратов в лечении МО и ДР [10].

### **1.2.2 Генетические факторы риска развития диабетической ретинопатии**

В настоящее время принято считать, что патогенез диабета является многофакторным, но генетические факторы риска играют в нем фундаментальную роль. Недавние исследования в области генома выявили несколько генетических локусов, участвующих в патогенезе, как диабета 1-го типа, так и диабета 2-го типа. Как отмечено выше, механизмы патогенеза диабетической ретинопатии разнообразны и достаточно сложны, однако не маловажную роль в них играют генетические факторы, которые, вероятно, определяют восприимчивость пациента к этой болезни, а также различия в частоте диабетической ретинопатии между индивидуумами с диабетом 1-го типа и 2-го типа.

Длительность диабета и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии ретинопатии [7, 28]. Однако эти факторы сами по себе не объясняют возникновение сосудистых осложнений [30]. В этой связи предполагается важная роль генетических факторов в развитии диабетической ретинопатии [30, 42, 82].

В 2009 году австралийскими исследователями был проведен мета-анализ результатов нескольких исследований, касающихся взаимосвязи между



генетическими факторами риска и развитием диабетической ретинопатии [93]. Авторами исследования было проанализировано 702 публикации, 160 из которых были посвящены геномному полиморфизму при диабетической ретинопатии. Было выделено порядка 196 полиморфизмов 20 генов. Полиморфизмы по генам NOS3, AKR1B1, VEGF, ITGA2, ICAM1, ADRB3, APOE ассоциированы с диабетической ретинопатией. Ген AKR1B1 имеет наибольшее число полиморфизмов, связанных с диабетической ретинопатией.

#### *1.2.2.1 Роль полиморфных маркеров гена AKR1B1, кодирующего альдозоредуктазу, в развитии диабетической ретинопатии*

Альдозоредуктаза представляет собой фермент, превращающий глюкозу в сорбит в НАДФН-зависимой реакции. Она находится в различных тканях, включая эндотелиальные, эпителиальные и пигментные клетки сетчатки. Сродство глюкозы к ферменту низкое, и поэтому достаточного количества сорбита не образуется в эугликемических условиях. Однако при наличии гипергликемии продуцируются значительные концентрации сорбита, который накапливается в клетках (поскольку он плохо диффундирует через билипидную мембрану) и вызывает их осмотическое повреждение [30, 55, 93]. Человеческий ген AKR1B1, кодирующий альдозоредуктазу, локализован на хромосоме 7q35 и состоит из 10 экзонов, протяженностью 18 тысяч пар нуклеотидов ДНК [30, 63, 151].

Описаны два клинически значимых полиморфизма в гене AKR1B1. Первый (A-C)<sub>n</sub> динуклеотидный полиморфный маркер на 5' конце гена AKR1B1. Из 7 аллелей данного локуса клиническое значение имеет лишь аллель z-2 [31]. Второй полиморфный маркер гена AKR1B1 локализуется в промоторе (rs759853) [14].

В мета-анализе S. Abhary и соавт. (2009) шести исследований по изучению динуклеотидного полиморфного маркера на 5' конце гена AKR1B1 была выявлена значительная связь z-2 аллеля с развитием любого типа диабетической ретинопатии.

В трех исследованиях была изучена связь второго полиморфизма гена AKR1B1 (rs759853) с диабетической ретинопатией при диабете 1-го типа и в пяти исследованиях при диабете 2-го типа. При проведении мета-анализа данных исследований установлено, что аллель Т ассоциируется с низким риском развития диабетической ретинопатии при сахарном диабете 1-го типа, в то время как достоверной связи у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа получено не было [14].

### 1.2.2.2 Роль полиморфных маркеров генов NOS, кодирующих NO-синтазы, в развитии диабетической ретинопатии

Показано, что при сахарном диабете снижается эндотелий-зависимая вазодилатация наряду с увеличением вазоконстрикции. В настоящее время считается, что одной из возможных причин aberrации кровотока в сетчатке в начале диабета является дисфункция эндотелия [14].

Выделяют три изоформы NO-синтазы – фермента, продуцирующего оксид азота (эндотелиальный релаксирующий фактор): нейрональная (NOS1), индуцибельная (NOS2A) и эндотелиальная (NOS3). В норме NOS2A в сетчатке не экспрессируется. Однако при повышении концентрации глюкозы ретинальные сосудистые эндотелиальные клетки начинают экспрессировать NOS2A и снижают экспрессию NOS3 [6, 13, 63].

Ген эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3) расположен на хромосоме 7q35-36 (рисунок 1). Описаны три полиморфизма данного гена (rs1799983, rs41322052 и rs3138808). Наиболее изученным является полиморфизм rs3138808 [6].

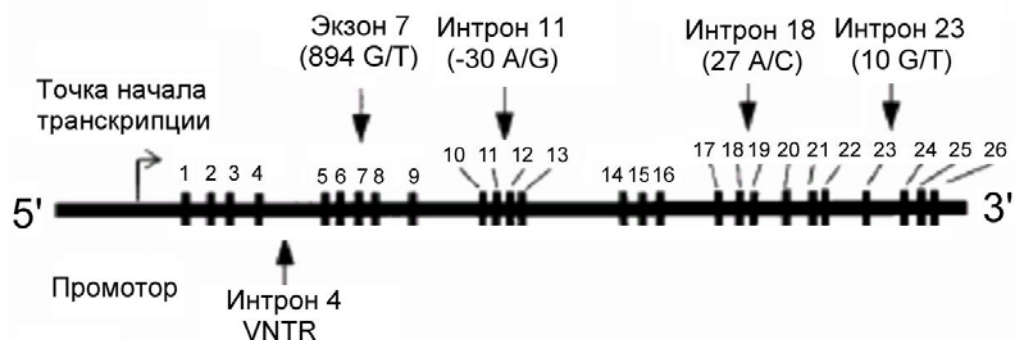


Рисунок 1 – Полиморфные участки гена NOS3

В исследованиях ряда авторов показано, что ген NOS3 ассоциирован с различными сосудистыми осложнениями при СД 1-го и 2-го типа. Мета-анализ, включающий 15 746 пациентов, выявил, что полиморфизм eсNOS4a|4b достоверно ассоциирован с тяжелым течением диабетической нефропатии у пациентов с СД 2-го типа в азиатской популяции [39].

### *1.2.2.3 Роль полиморфных маркеров гена VEGF, кодирующего сосудистый эндотелиальный фактор роста, в развитии диабетической ретинопатии*

Ряд клинических исследований выявил корреляцию между развитием диабетической ретинопатии и внутриглазным уровнем VEGF. Концентрация VEGF была значительно повышена в стекловидном теле и водянистой влаге пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией по сравнению с показателями пациентов, не страдающих диабетом, и пациентов с непролиферативной диабетической ретинопатией [27, 82].

VEGF представляет собой димерный гепарин-связывающий белок с молекулярной массой приблизительно 46 кДа. Человеческий ген VEGF состоит из 8 экзонов и 7 интронов и находится на 6 хромосоме (рисунок 2) [17, 181]. Было показано, что VEGF имеет четыре молекулярные формы, а также, что для него характерна таргетная специфичность, ограничивающаяся сосудистыми эндотелиальными клетками. Идентифицировано два тирозинкиназных рецептора VEGF (VEGF-R1 и VEGF-R2) [181, 182, 183].



Рисунок 2 – Структура гена VEGF

Молекулярные изоформы VEGF (VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, VEGF206) являются продуктами одного гена, образующимися в результате альтернативного сплайсинга мРНК. В гене VEGF выявлены полиморфные позиции –634, +936, –2578; обнаружены взаимосвязи вариантов нуклеотидов в этих позициях с риском развития ДР в разных этнических группах [98, 118]. По данным исследователей [98, 118], для больных СД 2-го типа свойственны комбинации гомозиготных вариантов VEGF 2578CC, 936CC, генов интерлейкинов и матриксных металлопротеиназ: IL4 590CC, IL6 174GG, IL10 592CC и 1082AA, TNFA 238GG, 308GG и 863CC, MMP-2 1306CC и MMP-9 1562CC. Особенности генотипа определяют нестабильный баланс ангиогенных и антиангиогенных факторов и могут являться одной из причин сложных нарушений регуляции ангиогенеза при СД [184, 185].

Шесть полиморфизмов гена VEGF были включены в мета-анализ по изучению их ассоциации с развитием диабетической ретинопатии, при этом полиморфизм rs2010963 изучался наиболее часто. Мета-анализ также не выявил значимой связи между полиморфизмом VEGF rs25648, rs1570360, rs3095039, rs35569394 или rs699947 и риском развития любого типа диабетической ретинопатии [93, 186].

В другом мета-анализе, в котором анализировали ассоциацию полиморфизма гена VEGF634G>C (rs2010963) с риском развития диабетической ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, были получены следующие результаты: взаимосвязи между полиморфизмом VEGF634G>C и диабетической ретинопатией были найдены в аллельной генетической модели и в рецессивной генетической модели [112, 143].

#### *1.2.2.4 Роль полиморфных маркеров гена ITGA2, кодирующего белок интегрин альфа-2, в развитии диабетической ретинопатии*

Ишемия сосудов является неизбежным осложнением диабета. С развитием методов молекулярной генетики в настоящее время установлено, что

полиморфизм генов системы гемостаза играет существенную роль в этиологии ишемии сосудов. В первую очередь это гены, продукты которых либо вовлечены в липидный гомеостаз, либо оперируют в системе свертывания крови или влияют на физиологию стенки сосудов.

В основе развития ишемии сосудов лежат два основных процесса – атеросклероз и тромбоз [13]. Атеросклеротические изменения сосудов более характерны для лиц пожилого возраста, а у молодых пациентов больший вклад в формирование патологии вносят нарушения в системе коагуляции, приводящие к повышенному тромбообразованию [30, 84].

Ген ITGA2 располагается на длинном (q) плече пятой хромосомы (рисунок 3), кодирует белок интегрин альфа-2 – мембранный гликопротеин, известный как GPIa (platelet glycoprotein Ia или very late activation protein (VLA)), экспрессирующийся на мембранах различных клеток, включая мегакариоциты, фибробласты и тромбоциты. На мембране тромбоцитов GPIa образует комплекс GPIIb/IIIa, представляющий собой один из рецепторов коллагена.

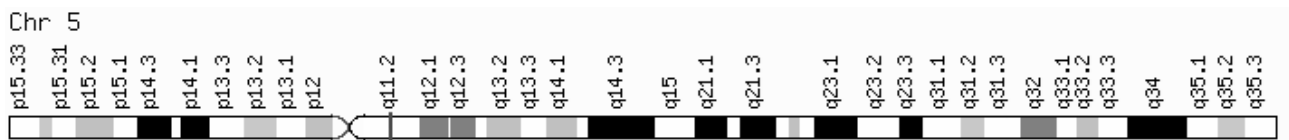


Рисунок 3 – Цитогенетическое строение пятой хромосомы

Одновременно с этим комплекс GPIa и GPIIb/IIIa служит одним из главных рецепторов коллагена, расположенных на клеточной мембране тромбоцитов и являющихся активатором агрегации тромбоцитов.

Известно несколько полиморфных вариантов гена GPIa (антигенный полиморфизм NPA5a/5b–A1648G (Lys505Glu); полиморфные локусы C-52T и C-92G в промоторной области гена GPIa, полиморфизм G873AG>A, влияющие на плотность рецепторного комплекса GPIa/IIb на мембране тромбоцитов).

Полиморфизм C807T представляет собой нуклеотидную замену цитозина (C) на тимин (T) в позиции 807 и не приводит к замене аминокислоты в пептидной

цепи молекулы альфа-2-субъединицы интегрина. Известно, что аллель Т полиморфного маркера С807Т гена ITGA2 ассоциирована с повышенной экспрессией GPIa-рецепторов тромбоцитов и повышенной адгезией тромбоцитов к коллагену. При этом повышенная экспрессия рецепторов GPIa/IIa обнаружена на поверхности тромбоцитов у гомозигот по аллели Т (генотип Т/Т), в то время как у гомозигот по аллели С (генотип С/С) наблюдается снижение экспрессии. Наличие Т-аллели ассоциируется с увеличением скорости адгезии тромбоцитов, а, следовательно, и с повышением риска развития ишемии сосудов и тромбоэмболии, и может быть использовано, по мнению авторов, для оценки риска развития тромбозов после ангиопластики и стентирования коронарных артерий [84].

#### *1.2.2.5 Роль полиморфных маркеров гена ICAM1 в развитии диабетической ретинопатии*

ICAM1 – молекула межклеточной адгезии 1-го типа. Молекулы межклеточной адгезии представляют собой связанные с плазматической мембраной белки, обеспечивающие высокоспецифичное взаимодействие между сосудистой стенкой и клетками крови.

ICAM1 относится к суперсемейству иммуноглобулинов (рисунок 4), является лигандом для интегриновых комплексов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), которые расположены на нейтрофилах и моноцитах. Полагают, что ICAM1 постоянно экспрессируется в эндотелиальных клетках сосудов и значительно усиливается при его стимуляции провоспалительными цитокинами и модифицированными липопротеинами.

Установлено, что VEGF стимулирует экспрессию ICAM1, которая повышает опосредованную адгезию лейкоцитов к эндотелию и является ключевым этапом в раннем ангиогенезе, что имеет важное значение в развитии эндотелиальной клеточной полярности, таким образом опосредуя миграцию эндотелиальных клеток [93, 133, 181].

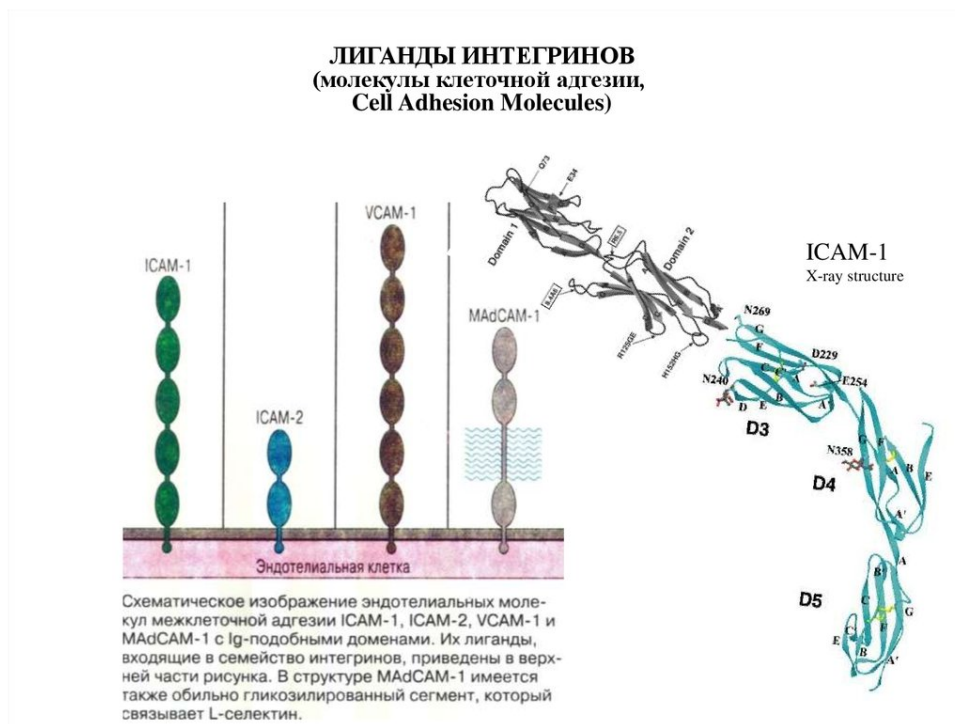


Рисунок 4 – Молекулы клеточной адгезии

Молекулы клеточной адгезии имеют большое значение в процессе развития и поддержания целостности архитектуры тканей у взрослых. В нормальной ткани экспрессия молекулы клеточной адгезии жестко регулируется.

#### 1.2.2.6 Роль полиморфных маркеров гена *ADRB3* в развитии диабетической ретинопатии

Адренергический бета-3 рецептор (*ADRB3*) расположен на коротком (p) плече восьмой хромосомы в положении 11.23 (рисунок 5) и экспрессируется преимущественно в висцеральной жировой ткани, жировом депо, которое тесно связано с родственными ожирению метаболическими осложнениями.

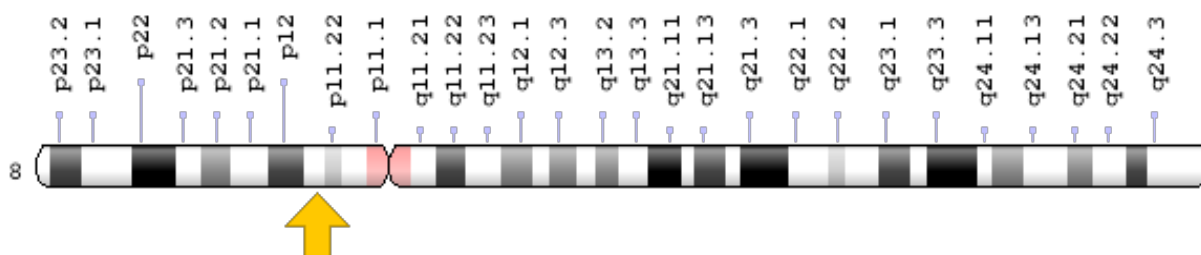


Рисунок 5 – Цитогенетическое строение восьмой хромосомы

Полиморфизм генов адренергических рецепторов может играть значительную роль в регуляции расхода энергии и липолизиса. Показано, что уменьшение активности ADRB3 приводит к замедлению окисления и повышенному накоплению жиров в белой жировой ткани за счет активации аденилатциклазы и усиления процессов липолиза в белой жировой ткани, а также продукции тепла в бурой жировой ткани, что может способствовать развитию ожирения [69, 106, 175].

Мутация в 64 кодоне гена ADRB3 с заменой триптофана на аргинин (Trp64Arg, rs4994) в белковом продукте гена ADRB3 играет важную роль в липолизе и регуляции жировой массы, что подтверждено в исследованиях *in vitro* на изолированных адипоцитах; 64Arg аллель подавляет липолиз и ассоциируется с повышенной массой тела. Trp64Arg единичная нуклеотидная замена (SNP) гена ADRB3 широко распространена в некоторых этнических группах и связана с увеличением индекса массы тела, висцеральным ожирением, резистентностью к инсулину и более ранним (на 22 года раньше) развитием СД 2-го типа [93, 106].

Данные о роли полиморфных локусов rs4994 гена ADRB3 и rs1800544, rs553668 гена ADRA2A в развитии метаболического синдрома противоречивы. В ряде исследований, проведенных среди населения Азии и Европы, выявлена ассоциация полиморфных локусов генов ADRB3, ADRA2A с развитием сахарного диабета 2-го типа, ожирения, гиперинсулинемии [93]. Вместе с тем в других работах подобной ассоциации показано не было [112, 143].

#### *1.2.2.7 Роль полиморфных маркеров гена APOE, кодирующего сосудистый аполипопротеин E, в развитии диабетической ретинопатии*

Аполипопротеин E (Apo E) входит в состав липопротеидов очень низкой, промежуточной и высокой плотности, а также ремнантов хиломикронов [21, 102]. Apo E играет роль вектора, обеспечивающего транспорт холестерина в печень и к тканям [21, 22, 65, 103]. В печени apo-E-рецепторы осуществляют захват и деградацию ремнантов хиломикронов, липопротеинов очень низкой плотности



(ЛОНП) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Структура и концентрация в крови каждого аполипопротеина находится под генетическим контролем, в то время как содержание липидов и липопротеидов в большей степени подвержено влиянию диетических и других факторов [65, 101, 104].

Ген, локализованный в 19-й хромосоме, 19-q13.32 (рисунок 6). Наиболее значимую ассоциацию с метаболизмом липидов имеют так называемые три эpsilon изоформы АРОЕ ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ), существование которых обусловлено сочетанием двух полиморфных локусов (SNP) rs7412 C > T (Arg158Cys) и rs429358 T > C (Cys112Arg). Изоформа  $\epsilon 3$  определяется при сочетании 112Cys-158Arg  $\epsilon 2$  – 112Cys-158Cys и  $\epsilon 4$  – 112Arg-158Arg, сочетания 112Arg-158Cys не встречается.

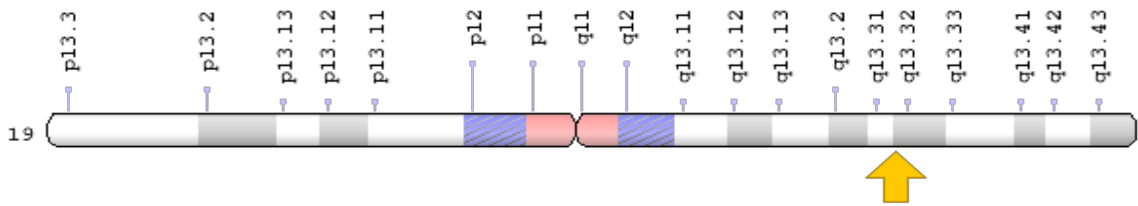


Рисунок 6 – Цитогенетическое строение 19-й хромосомы

Изоформы АРОЕ белка имеют разную эффективность связывания с рецептором к ЛПНП. АРОЕ  $\epsilon 3$  встречается у 70–80 % людей и считается благоприятным вариантом. АРОЕ  $\epsilon 2$  вариант встречается в 7–8 % случаев у европеоидов, имеет значительно меньшую связывающую способность к рецептору LPLR, и как следствие замедление клиренса триглицеридов (ТГ) из плазмы. Гомозиготное носительство  $\epsilon 2/\epsilon 2$  приводит к значительно более длительному сохранению постпрандиальной липидемии. С гомозиготным носительством  $\epsilon 2$  связывают развитие гиперлипопротеинемии III типа [21, 22, 104, 105].

Вариант АРОЕ  $\epsilon 4$  обнаруживается у 14 % европеоидов, он ассоциирован с гиперхолестеринемией, более высоким уровнем холестерина липопротеинов

низкой плотности (ЛПНП), является генетическим фактором риска сосудистых заболеваний.

Аро Е синтезируется в печени, мозге, макрофагах. Обнаружена ассоциация генотипов АРОЕ не только с метаболизмом липидов, но и окислительным стрессом, воспалительными процессами, вовлечённость в различные аспекты старения и процессы канцерогенеза [22, 65, 71].

Таким образом, анализ литературных источников свидетельствует о том, что диабетическая ретинопатия является многофакторным осложнением СД и распространенной патологией сетчатой оболочки глаза, в патогенезе которой существенную роль играют генетические факторы.

Большое число проведенных исследований, касающихся механизмов развития диабетической ретинопатии сформировали представление о ее патогенезе, как о многокомпонентном, многофакторном и взаимосвязанном процессе.

По аналогии с многофакторным механизмом формирования ДР, генетическая предрасположенность также кодируется не одним геном, а комплексом различных генов-кандидатов, кодирующих ключевые факторы поражения сетчатой оболочки глаза.

Проведенные исследования позволяют предполагать, что наиболее вероятные гены-кандидаты развития патологии – это гены вазоактивных факторов эндотелия и эндотелиальной дисфункции, факторов липидного обмена, воспаления и ангиогенеза, и гены, регулирующие инсулиновую секрецию.

Изучение генетических маркеров ДР имеет приоритетное значение, поскольку их идентификация приблизит возможность прогнозирования патологии на доклиническом этапе, а также обеспечит оптимальный выбор средств профилактики и лечения данного осложнения.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1 Формирование выборки и методология исследования

Клинические исследования проводились на базе ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского». Выделение ДНК и анализ полиморфных маркеров генов осуществлялись на базе ООО «ТестГен» (г. Ульяновск) (договор о научно-техническом сотрудничестве и конфиденциальности № 241 от 19 января 2015 г.).

Исследование одобрено этическим комитетом частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» № 493 от 02 февраля 2015 г.)

Всего в исследование были включены 475 пациентов.

Материалом для исследований явились пробы венозной крови, полученные от пациентов, больных сахарным диабетом 2-го типа, прошедшие офтальмологический и эндокринологический осмотры.

Объект исследования – ДНК пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

Предмет исследования – полиморфизмы генов-кандидатов развития диабетической ретинопатии в ДНК пациентов с сахарным диабетом 2-го типа

Критериями включения пациентов в исследование служили следующие факторы:

- наличие сахарного диабета 2-го типа;
- длительность заболевания – 10 лет и более от момента постановки диагноза;
- возраст старше 18 лет;
- наличие подписанного пациентом информированного согласия на участие в научном исследовании;

- наличие заключения по результатам офтальмологического осмотра;
- наличие результатов анализов крови на гликированный гемоглобин и глюкозу.

Критерии исключения пациента из исследования:

- сахарный диабет 1-го типа;
- хронические соматические заболевания в стадии декомпенсации;
- заболевания сетчатки, затрудняющие диагностику диабетической ретинопатии.

У 272 пациентов на момент осмотра диабетической ретинопатии не наблюдалось, у 100 пациентов отмечена непролиферативная ДР, у 23 – препролиферативная ДР, у 80 – пролиферативная ДР.

Обследование выполнялось на добровольной основе, в соответствии с международными этическими требованиями, предъявляемыми к медицинским исследованиям с участием человека (Хельсинкская Декларация 1975 г., последний пересмотр 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, 2013). Все пациенты имели право добровольно выйти из исследования по собственному желанию, уведомив об этом исследователя в письменной или устной форме.

В работе применяли следующие методы исследования: общеклиническое обследование (офтальмологический осмотр и анализ биохимических показателей крови) и молекулярно-генетический анализ (анализ полиморфных маркеров генов методом ПЦР в реальном времени). Дизайн исследования представлен на рисунке 7.

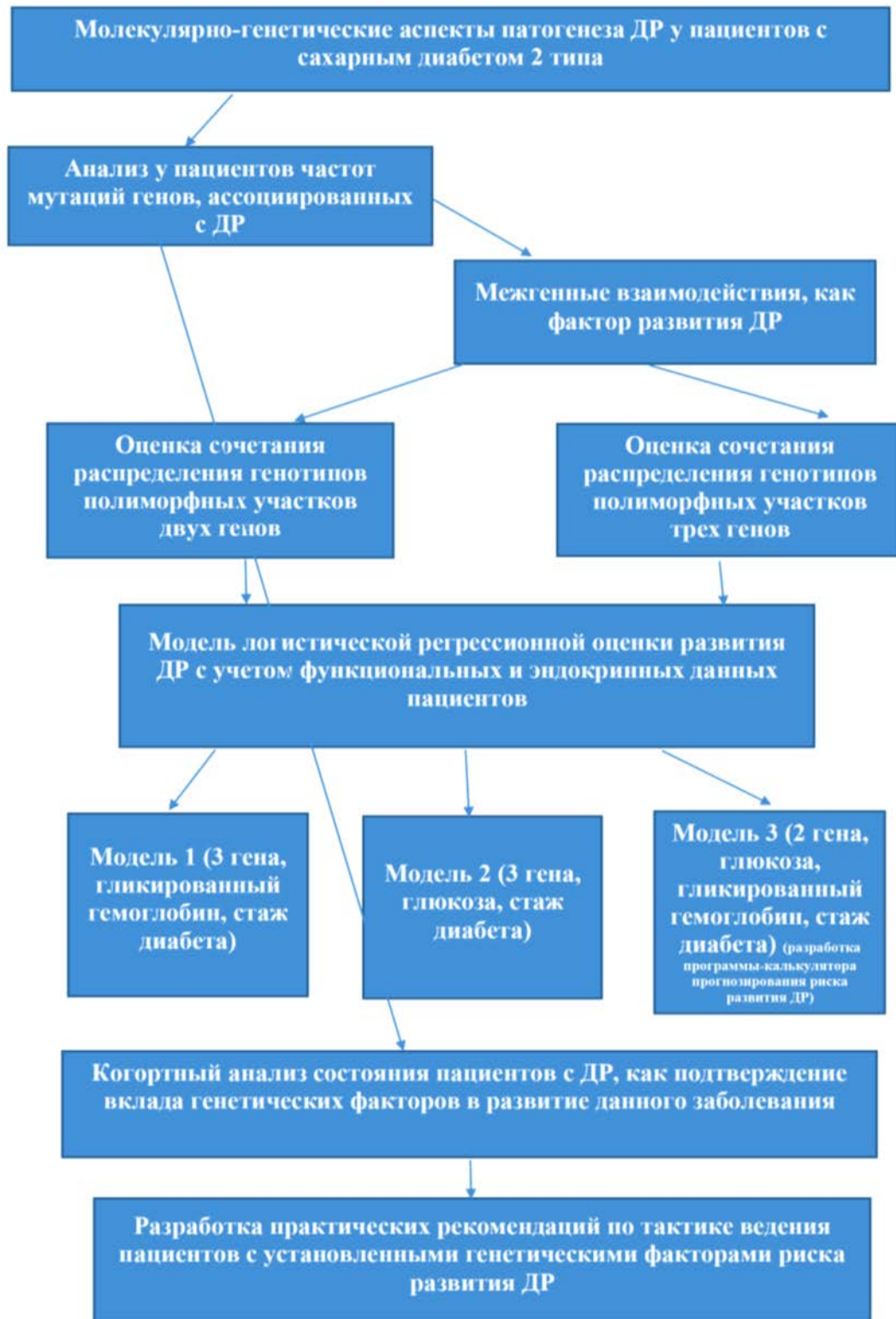


Рисунок 7 – Дизайн диссертационного исследования

## 2.2 Клиническая характеристика пациентов

Результаты диссертационной работы основаны на данных комплексного клинико-лабораторного обследования 475 пациентов: 79 мужчин и 396 женщин (17 % и 83 % соответственно), обратившихся за медицинской помощью в период с 2015 по 2018 года. Возраст обследованных составил от 24 до 89 лет, в среднем  $64,4 \pm 9,6$  года (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика больных сахарным диабетом по возрасту

	ДР отсутствует M ± s, n = 272	ДР имеется, M ± s, n = 273	p
Возраст, годы*	$65,38 \pm 10,36$	$63,14 \pm 8,37$	0,003
Возрастная группа**			
Молодой возраст (до 45 лет)	11 (2,0 %)	6 (3,0 %)	< 0,001
Средний возраст (45–59 лет)	58 (21,3 %)	51 (25,1 %)	
Пожилой возраст (60–74 года)	141 (51,8 %)	132 (65,0 %)	
Старческий возраст (75–90 лет)	62 (22,8 %)	14 (6,9 %)	

Примечание: \* – результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения ( $M \pm s$ ); \*\* – результаты представлены в виде числа наблюдений и процентов по группе.

Следует отметить, что изученные группы пациентов оказались несопоставимыми по возрасту, причем пациенты более старшего возраста были среди обследованных без диабетической ретинопатии ( $65,38 \pm 10,36$  года против  $63,14 \pm 8,37$  с ретинопатией). Эти отличия обусловлены, в первую очередь, преобладанием лиц старческого возраста (75–90 лет) в группе без диабетической ретинопатии (22,8 % против 6,9 %) и наоборот, преобладанием пожилых лиц (60–75 лет) среди обследованных с диабетической ретинопатией. Можно предположить, что диабетическая ретинопатия была одним из проявлений микро- и макрососудистых проявлений сахарного диабета, которые в совокупности

привели к меньшей обращаемости таких больных в лечебные учреждения, и, не исключено, что и к их смерти.

Больные с диабетической ретинопатией характеризовались разными стадиями данного заболевания. Распределение пациентов по полу и наличию диабетической ретинопатии, а также стадиям заболевания представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика пациентов по полу и наличию ДР

Пол	Отсутствие ретинопатии		Непролиферативная стадия ДР		Препролиферативная стадия ДР		Пролиферативная стадия ДР		$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%		
Мужчины	43	15,8 %	19	19,0 %	3	13,0 %	14	17,5 %	0,79	0,851
Женщины	229	84,2 %	81	81,0 %	20	87,0 %	66	82,5 %		
Итого	272	100 %	100	100 %	23	100 %	80	100 %		

По данным, представленным в таблице, видно, что 272 пациента, больные сахарным диабетом, характеризуются отсутствием ретинопатии. При этом непролиферативной формой ДР больны 100 человек, препролиферативной формой ДР – 23 человека и пролиферативной формой – 80 человек. Мужчины и женщины представлены в группах статистически сопоставимо ( $p = 0,851$ ). Соотношение мужчин и женщин с различными стадиями ДР представлено на рисунке 8.

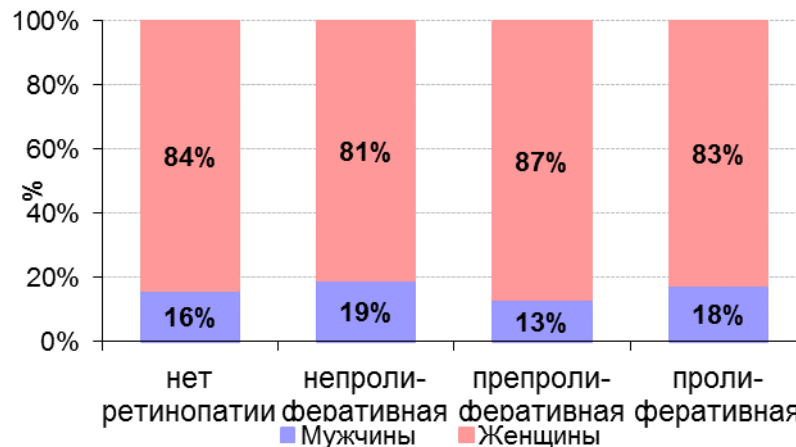


Рисунок 8 – Распределение пациентов с различными стадиями ДР по полу

Очевидно, что во всех группах преобладали женщины и составляли от 82 до 84 %.

Также нами учитывался этнический состав обследованных: 84 % русские, 3,5 % татары, 2 % башкиры, 3,6 % мордва, 2,1 % чуваша, 4,8 % пациенты из восточнославянской популяции Поволжья (таблица 3).

Таблица 3 – Распределение пациентов с сахарным диабетом по национальной принадлежности

Национальность	Стадии ДР				Итого
	Отсутствие ретинопатии	Непролиферативная	Препролиферативная	Прролиферативная	
Нет данных	15,10 %	13,00 %	8,70 %	20,00 %	15,20 %
Русские	71,30 %	74,00 %	60,90 %	58,80 %	69,30 %
Чуваши	1,50 %	4,00 %	–	2,50 %	2,10 %
Башкиры и татары	4,80 %	5,00 %	17,40 %	5,00 %	5,50 %
Армяне	–	–	–	1,30 %	0,20 %
Азербайджанцы	–	1,00 %	–	1,30 %	0,40 %
Грузины	0,40 %	–	–	–	0,20 %
Мордва	4,00 %	1,00 %	–	6,30 %	3,60 %
Беларусы	0,70 %	–	4,30 %	1,30 %	0,80 %
Украинцы	1,10 %	2,00 %	4,30 %	2,50 %	1,70 %
Коми	0,40 %	–	4,30 %	–	0,40 %
Казахи	0,40 %	–	–	1,30 %	0,40 %
Марий Эл	0,40 %	–	–	–	0,20 %
Итого	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %

Исходя из представленных данных, видно, что среди наших пациентов преобладали больные из восточнославянской популяции Поволжья.

Установлено, что одним из симптомов проявления диабетической ретинопатии является макулярный отек в разных стадиях. Нами проведена оценка распределения пациентов по наличию макулярного отека и стадиям его проявления (рисунок 9).



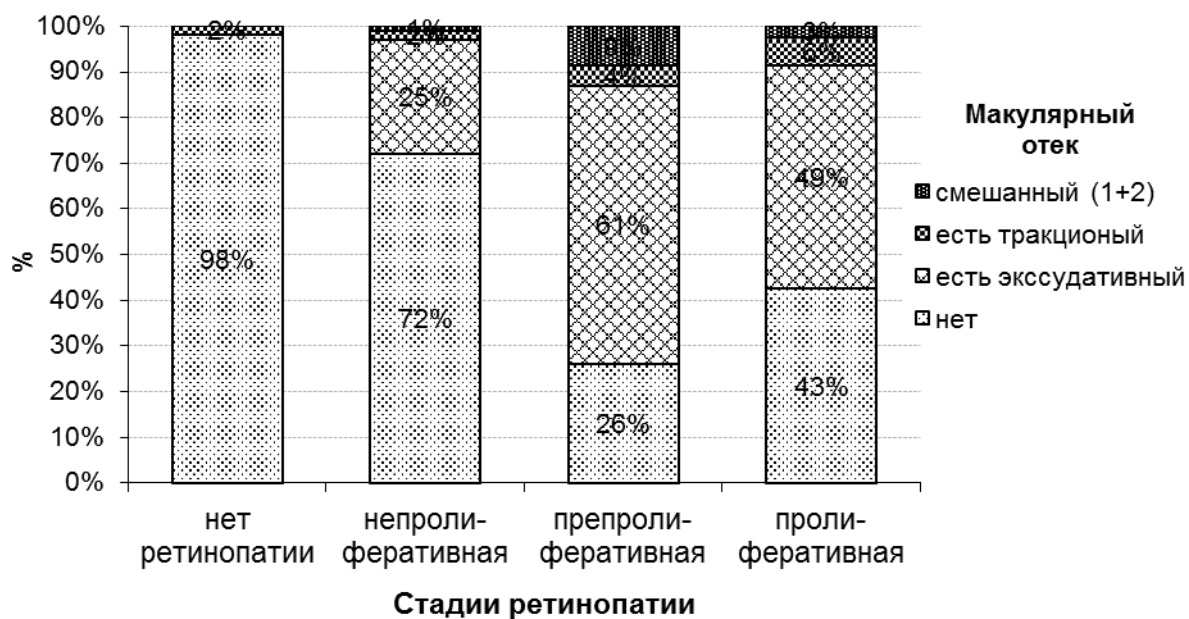


Рисунок 9 – Распределение пациентов с различными стадиями ДР по наличию макулярного отека и стадиям его проявления

Таким образом, 2 % пациентов, у которых отсутствовала ДР, характеризовались тракционным макулярным отеком, что является предиктором развития ДР. У 25 % пациентов с непролиферативной стадией ДР наблюдался эксудативный отек, у 2 % – тракционный макулярный отек и у 1 % – смешанный. 61 % пациентов с препролиферативной ДР характеризовались эксудативным отеком, 4 % – тракционным и 9 % – смешанным макулярным отеком. Пациенты с пролиферативной ДР в 49 % случаев характеризовались эксудативным отеком, 6 % – тракционным и 3 % – смешанным макулярным отеком.

Нами также была проведена оценка возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и ее форм у пациентов с сахарным диабетом (таблица 4).

Установлено, что у пациентов с отсутствием ДР в 11,80 % случаев наблюдается сухая форма ВМД и в 1,10 % – влажная форма ВМД. Причем влажная форма ВМД наблюдалась только у больных с отсутствием ДР и с пролиферативной стадией ДР (0,6 %). У пациентов с непролиферативной стадией ДР в 11,0 % случаев наблюдается сухая форма ВМД, у больных с препролиферативной стадией ДР – в 4,3 % случаев и с пролиферативной стадией – в 9,9 % случаев.

Таблица 4 – Распределение пациентов по наличию возрастной макулярной дегенерации

ВМД	Стадии ДР				Итого
	Отсутствие ретинопатии	Непролиферативная	Препролиферативная	Пролиферативная	
Отсутствует	87,10 %	89,00 %	95,70 %	96,30 %	89,50 %
Имеется сухая форма	11,80 %	11,00 %	4,30 %	3,80 %	9,90 %
Имеется влажная форма	1,10 %	–	–	–	0,60 %
Итого	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %

### 2.3 Общеклинические методы исследования

Объективное обследование пациентов включало сбор жалоб, анализ анамнестических данных, осмотр. Проводили антропометрическое обследование, измерение артериального давления. Для каждого пациента проводили расчет индекса массы тела по формуле отношения массы тела в килограммах к квадратному значению роста, выраженному в метрах ( $\text{кг}/\text{м}^2$ ). Пациенты были осмотрены офтальмологом и эндокринологом.

В ходе офтальмологического исследования пациентам проводился стандартный офтальмологический осмотр, который включал в себя:

- определение остроты зрения с коррекцией (визометрия);
- измерение внутриглазного давления (тонометрия);
- расширение зрачка (закапыванием мидриатиков);
- фоторегистрацию глазного дна с помощью фундус-камеры;
- флюоресцентную ангиографию глазного дна (ФАГД);
- оптическую когерентную томографию сетчатки;
- биомикроскопию переднего отрезка глаза;
- офтальмоскопию сетчатки с помощью сферических и/или контактных линз.

Также использовали метод стереоскопического фотографирования с помощью фундус-камеры семи стандартных полей сетчатки. Данная методика

оценки разработана в Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). По полученным результатам создана шкала оценки прогрессирования ДР. После проведения прямой офтальмоскопии с расширенным зрачком производится фотографирование сетчатки (рисунок 10), и результаты оцениваются по шкале (рисунок 11).

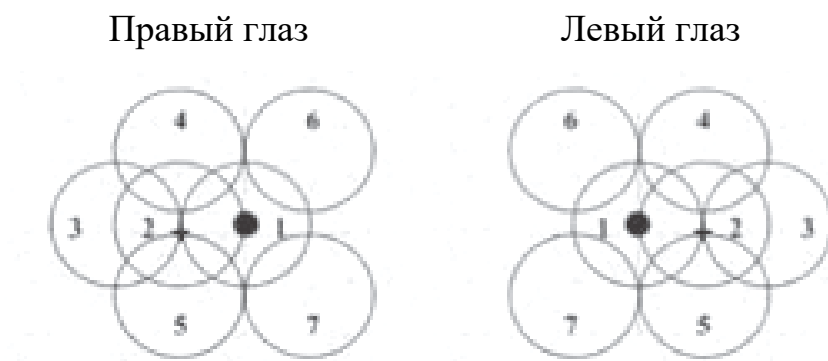


Рисунок 10 – Шкала ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study)

Классификация диабетической ретинопатии ETDRS (1991)	
Уровень	Стадия ретинопатии
10	Нет ретинопатии
35	Начальная непролиферативная
43	Умеренная непролиферативная
47	Выраженная непролиферативная
53	Тяжелая непролиферативная
61	Начальная пролиферативная
65	Выраженная пролиферативная
71	Тяжелая пролиферативная (риск А)
75	Тяжелая пролиферативная (риск Б)
81	Далекозашедшая пролиферативная
90	Градация невозможна

Рисунок 11 – Классификация ДР по баллам шкалы ETDRS

Затем по шкале проводится подсчет следующих патологических изменений в каждом из семи полей в правом и левом глазу соответственно:

- микроаневризмы;
- гемorragии;
- твердые экссудаты;

- ватные мягкие экссудаты;
- аномалии калибра вен;
- перивенозные экссудаты;
- аномалии артериол;
- ИРМА (интратретинальные микрососудистые аномалии);
- артериовенозные перетяжки;
- фиброзная пролиферация;
- возвышение сетчатки;
- неоваскуляризация;
- преретинальные геморрагии;
- витреальные геморрагии;
- очаги ЛФК;
- поля макулярного отека;
- уплотнение макулярного отека.

Отдельно проводится оценка состояния сетчатки в области диска зрительного нерва и макулярной области (поле 1 и 2). Затем каждое из найденных изменений оценивается в баллах от 0 (нет изменений) до 8 (оценка невозможна). Затем по каждому глазу баллы суммируются.

Самая тяжелая степень поражения сетчатки выражается 81–85 баллами. Уровень от 10 до 21 балла считается нормальным. О прогрессировании ДР свидетельствует переход через два уровня.

В ходе эндокринологического осмотра определяли тип, стаж, и вид терапии сахарного диабета, а также проводили стандартное лабораторное исследование на базе лаборатории «IN VITRO» Самара (договор от 9 февраля 2015 года № 025), которое включало следующие биохимические исследования:

- определение уровня общего холестерина;
- определение уровня триглицеридов;
- определение уровня глюкозы;
- анализ крови на гликированный гемоглобин.

Эндокринолог оценивал компенсацию углеводного обмена по уровню гликированного гемоглобина, определяемого методом ионно-обменной хроматографии на автоматическом биохимическом анализаторе Bio-RAD D-10 (Франция) по стандартной методике производителя.

## **2.4 Молекулярно-генетические методы исследования**

Отбор проб венозной крови проводился на базе ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского». Венозную кровь забирали в объеме 5–8 мл. Для забора венозной крови использовали стерильные пробирки, содержащие CPDA в качестве антикоагулянта смесь лимонной кислоты, фосфата натрия, декстрозы и аденина (производитель Greiner-Bio-One, Австрия). После тщательного перемешивания образцы помещались в морозильную камеру и хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения процедуры выделения ДНК.

Выделение и очистку геномной ДНК для последующего проведения ПЦР осуществляли из цельной крови набором «ДНК-Кровь-М» (производства ООО «ТестГен», г. Ульяновск), основанном на методе обратимой адсорбции ДНК на магнитных частицах.

Выделение ДНК выполняли согласно инструкции к примененному набору по следующему протоколу:

1. Размораживали и тщательно перемешивали методом пипетирования образцы венозной крови.
2. В 1,5 мл пробирке 200 мкл венозной крови смешивали с равным количеством осаждающего буфера (200 мкл), перемешивали на вортексе и инкубировали в течении 10 мин при  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
3. После инкубирования пробирки охлаждали до  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , добавляли 25 мкл протеиназы-К и в течении 20 мин при  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  инкубировали.
4. В пробирку вносили 270 мкл раствора магнитных частиц (в отдельной пробирке предварительно смешивали 250 мкл связывающего буфера и 20 мкл

магнитных частиц). Перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре 5 мин.

5. Пробирки помещали в магнитный штатив, удаляли супернатант.

6. В пробирку добавляли 700 мкл промывочного раствора 1. Перемешали на вортексе и помещали в магнитный штатив, удаляли супернатант.

7. В пробирку вносили 700 мкл промывочного раствора 2, перемешивали на вортексе, помещали в магнитный штатив, удаляли супернатант. Процедуру промывки раствором 2 повторяли.

8. Помещали пробирки в термостат и инкубировали с открытыми крышками 10 мин при 60 °С.

9. В пробирку вносили 60 мкл элюирующего буфера, ресуспендировали на вортексе и инкубировали в термостате 10 мин при 60 °С с закрытыми крышками, периодически перемешивая на вортексе (1–2 сек).

10. Помещали пробирки в магнитный штатив и переносили супернатант, содержащий ДНК, в новую пробирку.

Для проведения амплификации участков генов-кандидатов, содержащих полиморфные маркеры были использованы олигонуклеотидные праймеры. Для построения кривых плавления использовались флуоресцентно-меченные зонды. Олигонуклеотиды подбирались на основании данных NCBI GeneBank. Праймеры и зонды были синтезированы ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва). Отобранные для проведения исследования олигонуклеотиды и их характеристики представлены в таблицах 6–11.

Таблица 6 – Характеристика разработанных праймеров и зондов для гена-кандидата VEGF\_rs2010963

Олигонуклеотид	Показатель	Характеристика
Праймеры		
Прямой: F1	структура от 5' к 3'	ACTTCCCCAAATCACTGTGGA
	длина, нукл	21
Обратный: R3	структура от 5' к 3'	CGCTCCGGCGGTCAC
	длина, нукл	15
Зонды		
VICE II.re.L	структура от 5' к 3'	<b>VIC-CTGTCCCTTTCGCTG-P</b>
	длина, нукл	15
FAME II.re	структура от 5' к 3'	<b>FAM-CTGTTCGCTTTCGCT-P</b>
	длина, нукл	14
BHQ1 II.near	структура от 5' к 3'	AGGTCACTCACTTTGCC- <b>BHQ1</b>
	длина, нукл	17

Таблица 7 – Характеристика разработанных праймеров и зондов для гена-кандидата ADRB3\_rs4994

Олигонуклеотид	Показатель	Характеристика
Праймеры		
Прямой: F3	структура от 5' к 3'	CCAGCGAAGTCACGAACAC
	длина, нукл	19
Обратный: R3	структура от 5' к 3'	CCCAATACCGCCAACACCA
	длина, нукл	19
Зонды		
VICE	структура от 5' к 3'	GGAGTCCAGGCGA- <b>VIC</b>
	длина, нукл	13
FAME	структура от 5' к 3'	GAGTCCGGGCGA- <b>FAM</b>
	длина, нукл	12
BHQ1	структура от 5' к 3'	<b>BHQ1-GGCCACGATGACCAG-Phos.</b>
	длина, нукл	15

Таблица 8 – Характеристика разработанных праймеров и зондов для гена-кандидата AKR1B1\_rs759853

Олигонуклеотид	Показатель	Характеристика
Праймеры		
Прямой: F7	структура от 5' к 3'	AAATAGCCCGTGAGGTCGG
	длина, нукл	19
Обратный: R1	структура от 5' к 3'	ACTAGGACCAGGGGAAGAA
	длина, нукл	20
Зонды		
VICE	структура от 5' к 3'	TGCGCTGGGGG-VIC
	длина, нукл	11
FAME	структура от 5' к 3'	TTGCGCTAGGGG-FAM
	длина, нукл	12
BHQ1	структура от 5' к 3'	<b>BHQ1-GCCGCGGCGG-Phos.</b>
	длина, нукл	10

Таблица 9 – Характеристика разработанных праймеров и зондов для гена-кандидата ITGA2\_rs2910964

Олигонуклеотид	Показатель	Характеристика
Праймеры		
Прямой: F4.2	структура от 5' к 3'	AAAGAATGAGACCTTCATGTATATACATGT
	длина, нукл	30
Обратный: R4.5	структура от 5' к 3'	AAATGAGGGCATAATTCTAAACAGTTGTT
	длина, нукл	28
Зонды		
VICE I.2	структура от 5' к 3'	<b>VIC-CTGATATGGAAAGGTCTC-VIC</b>
	длина, нукл	18
FAME I.2	структура от 5' к 3'	<b>FAM-CTGATATGGAAAGATCTC-FAM</b>
	длина, нукл	18
BHQ1	структура от 5' к 3'	<b>BHQ1-ATCAAAGTAAAAACAACCTGTTTAG-P</b>
	длина, нукл	25
BHQ1/1 I	структура от 5' к 3'	GAGACCTTCATGTATATACATGT-BHQ1
	длина, нукл	23



Таблица 10 – Характеристика разработанных праймеров и зондов для гена-кандидата APOE\_rs7412

Олигонуклеотид	Показатель	Характеристика
Праймеры		
Прямой: 1-F	структура от 5' к 3'	<b>GCCAGAGCACCGAGGAG</b>
	длина, нукл	17
Обратный: 1-R	структура от 5' к 3'	<b>CGGCCCTGTTCCACCAG</b>
	длина, нукл	17
Зонды		
VICE I.2 L	структура от 5' к 3'	<b>VIC-GCAGAAGCGCCTGG-VIC</b>
	длина, нукл	14
FAME I.2 L	структура от 5' к 3'	<b>FAM-CAGAAGTGCCTGGCA-FAM</b>
	длина, нукл	15
BHQ1/1 I L	структура от 5' к 3'	<b>CGCGATGCCGATGACC-BHQ1</b>
	длина, нукл	16
BHQ1/2 I L	структура от 5' к 3'	<b>BHQ1-TGTACCAGGCCGGGG-P</b>
	длина, нукл	15

Таблица 11 – Характеристика разработанных праймеров и зондов для гена-кандидата APOE\_rs429358

Олигонуклеотид	Показатель	Характеристика
Праймеры		
Прямой: 1-F	структура от 5' к 3'	<b>GCACGGCTGTCCAAGGAG</b>
	длина, нукл	18
Обратный: 1-R	структура от 5' к 3'	<b>TTCTGCAGGTCATCGGCATC</b>
	длина, нукл	20
Зонды		
VICE I L	структура от 5' к 3'	<b>GGACGTGTGCGGC-VIC</b>
	длина, нукл	13
FAME I L	структура от 5' к 3'	<b>GACGTGCGCGGC-FAM</b>
	длина, нукл	12
BHQ1/2 I.near	структура от 5' к 3'	<b>BHQ1-GCCTGGTGCAGTACCG-P</b>
	длина, нукл	16

Для амплификации использовали Taq ДНК-полимеразу с горячим стартом, 10x Taq Turbo буфер; для амплификации GC-богатых регионов – Encyclo полимеразы и набор реактивов "Encyclo Plus PCR kit", а также dNTP производства ЗАО «Евроген» (г. Москва).

ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе DTprime (ООО «ДНК-Технология», г. Москва).

ПЦР проводили в объеме реакционной смеси – 20 мкл. Проверку качества и термодинамический анализ выбранных праймеров выполняли с помощью программы OLIGO DNA/RNA primer analysis software, v.5.0 и BLAST (USA). На основании выполненного компьютерного анализа были смоделированы несколько пар праймеров для каждого из генов-кандидатов. Испытания *in vitro* показали, что наиболее четкие результаты получаются при использовании пар праймеров и зондов, характеристика которых приведена в таблицах 6–11. Подобранные комбинации олигонуклеотидов имеют оптимальную структуру (отсутствие само- и взаимокomплементарности) и размер (10–28 п.н.), а также GC состав (42,3–47,8 %).

Процесс амплификации состоял из первичной денатурации, циклов амплификации и построения кривой плавления. Протокол амплификации был оптимизирован экспериментально (рисунок 12).



- |    |                 |  |              |
|----|-----------------|--|--------------|
| 1. | 95,0 °C - 02:00 |  |              |
| 2. | 64,0 °C - 00:40 |     | ] x 50       |
|    | 94,0 °C - 00:10 |  |              |
| 3. | 25,0 °C - 00:30 |  |              |
| 4. | 25,0 °C - 00:15 |  Δt | ] x 50 (1,0) |

Рисунок 12 – Программа амплификации

## 2.5 Статистическая обработка результатов

Статистический анализ данных выполняли в среде пакета IBM SPSS 21. Описательная статистика для количественных признаков приведена в виде среднего и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ), а для качественных в виде абсолютных значений и частот (%). Для сравнения количественных признаков применяли критерий Манна-Уитни-Вилкоксона. Для сопоставления частот генотипов с наличием диабетической ретинопатии применяли критерий хи-квадрат Пирсона ( $\chi^2$ ) и рассчитывали отношение шансов (ОШ) и его 95 % доверительный интервал (95 % ДИ). Для разработки прогностической модели риска развития ретинопатии применяли множественную логистическую регрессию. Качество прогнозирования оценивали с помощью ROC-кривых.

Для выделения мультилокусных генотипов, то есть сочетаний генотипов по различным генам, ассоциированных с большим или меньшим риском ретинопатии, применяли метод MDR (multifactor dimensionality reduction), реализованный в программном продукте MDR software (version 3.0.2).

Метод MDR – непараметрический, т.е. не предполагает какой-либо генетической модели и не оценивает какие-либо параметры. Он выбирает сочетания генотипов по различным генам, ассоциированные с большим или меньшим риском изучаемого заболевания. Качество прогнозирования при этом проверяется с помощью процедуры кросс-валидации и перестановочного тестирования (permutation testing).

Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05 [68].

## ГЛАВА 3

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Характеристика пациентов по факторам риска развития диабетической ретинопатии

Нами были проанализированы характеристики пациентов, больных сахарным диабетом 2-го типа, по основным факторам риска развития диабетической ретинопатии (таблица 12).

Исходя из представленных табличных данных, пациенты с различными стадиями ДР достоверно отличались по остроте зрения правого (OD) и левого (OS) глаза от пациентов без ДР (рисунок 13, 14).

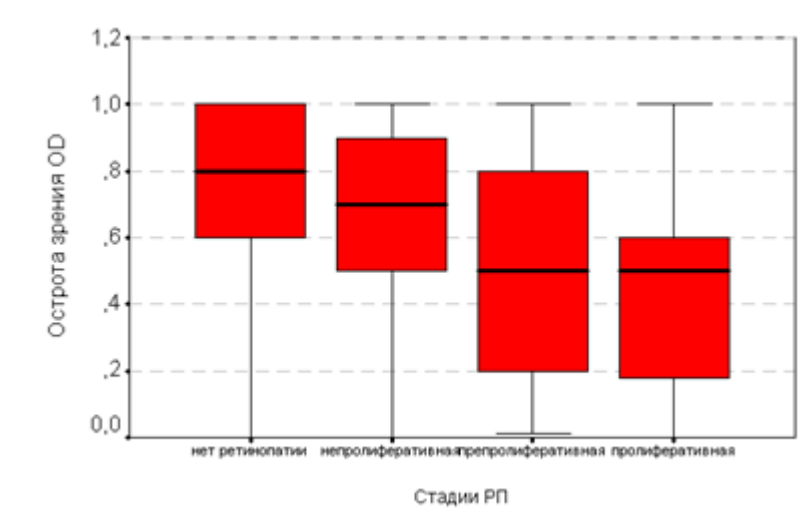


Рисунок 13 – Острота зрения OD у пациентов без ДР и с различными стадиями ДР

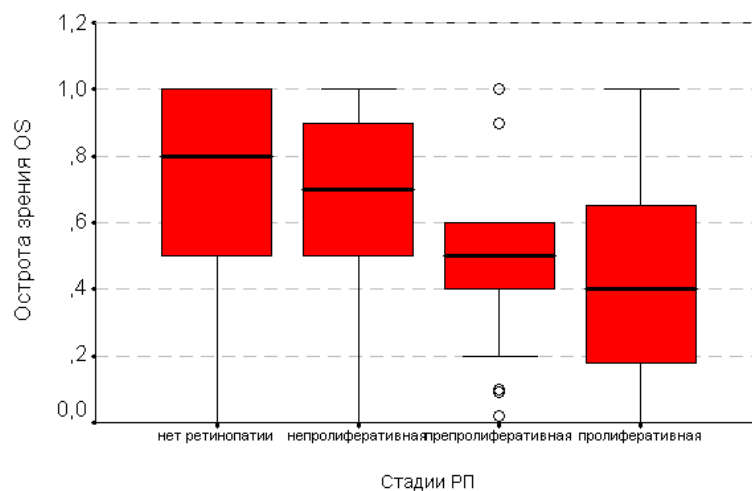


Рисунок 14 – Острота зрения OS у пациентов без ДР и с различными стадиями ДР

Таблица 12 – Характеристика пациентов по факторам риска развития ДР

Параметры пациентов	Отсутствие ретинопатии M ± s	Непролиферативная ДР M ± s	Препролиферативная ДР M ± s	Пролиферативная, ДР M ± s	p <sub>ANOV</sub> A	p0-1	p0-2	p0-3	p1-2	p1-3	p2-3
Возраст	65,38 ± 0,63	63,36 ± 0,86	66,13 ± 1,34	62,01 ± 0,94	0,021	0,308	0,996	0,020	0,417	0,872	0,087
Острота зрения OD	0,76 ± 0,02	0,66 ± 0,03	0,51 ± 0,07	0,44 ± 0,03	<0,001	0,013	0,016	<0,001	0,329	<0,001	0,921
Острота зрения OS	0,74 ± 0,02	0,65 ± 0,03	0,50 ± 0,06	0,43 ± 0,03	<0,001	0,081	0,005	<0,001	0,150	<0,001	0,856
Внутриглазное давление OD	21,15 ± 0,19	21,36 ± 0,35	20,68 ± 0,58	20,49 ± 0,32	0,267	0,995	0,968	0,397	0,895	0,342	1,000
Внутриглазное давление OS	21,35 ± 0,19	21,65 ± 0,27	20,70 ± 0,64	21,59 ± 0,33	0,514	0,935	0,898	0,990	0,669	1,000	0,762
Холестерин	6,66 ± 0,09	6,42 ± 0,15	6,53 ± 0,35	6,77 ± 0,19	0,449	0,668	0,999	0,997	1,000	0,614	0,990
Триглицериды	1,90 ± 0,07	2,01 ± 0,11	1,66 ± 0,20	1,94 ± 0,13	0,601	0,957	0,823	1,000	0,572	0,999	0,801
Глюкоза, ммоль/л	8,23 ± 0,17	10,20 ± 0,32	9,80 ± 0,71	10,95 ± 0,45	<0,001	<0,001	0,218	<0,001	0,996	0,690	0,676
Гликированный гемоглобин %	7,37 ± 0,09	8,65 ± 0,18	8,58 ± 0,34	8,90 ± 0,19	<0,001	<0,001	0,015	<0,001	1,000	0,911	0,960
Стаж диабета, годы	8,94 ± 0,43	14,47 ± 0,78	15,19 ± 1,78	18,14 ± 0,91	<0,001	<0,001	0,014	<0,001	0,999	0,016	0,602
ИМТ	31,58 ± 0,42	31,43 ± 0,57	32,51 ± 1,48	30,64 ± 0,57	0,576	1,000	0,989	0,707	0,981	0,909	0,799
АД систолическое	142,76 ± 1,22	143,80 ± 1,93	147,52 ± 2,51	142,75 ± 2,17	0,727	0,998	0,444	1,000	0,804	0,999	0,629
АД диастолическое	85,79 ± 0,55	85,88 ± 0,93	83,90 ± 1,76	86,75 ± 0,94	0,618	1,000	0,881	0,941	0,896	0,986	0,635

У пациентов с непролиферативной стадией ДР острота зрения правого глаза была ниже, чем у пациентов с отсутствием ДР, в среднем на 13,2 %, у пациентов с препролиферативной стадией ДР – ниже на 32,9 % и с пролиферативной стадией – ниже на 42,1 %.

У пациентов с непролиферативной стадией ДР острота зрения левого глаза была ниже, чем у пациентов с отсутствием ДР, в среднем на 12,2 %, у пациентов с препролиферативной стадией ДР – ниже на 32,4 % и с пролиферативной стадией – ниже на 41,9 %.

По таким параметрам, как внутриглазное давление правого и левого глаза, также концентрация холестерина и триглицеридов в сыворотке крови достоверных отличий между пациентами без ДР и с ДР в разной стадии развития не наблюдалось.

Сравнение изучаемых групп пациентов показало, что у больных с наличием ДР более высокий уровень глюкозы и гликированного гемоглобина по сравнению с группой с ее отсутствием, а также больше стаж сахарного диабета.

У пациентов с непролиферативной стадией ДР и пролиферативной стадией ДР установлена концентрация глюкозы  $10,20 \pm 0,32$  ммоль/л и  $10,95 \pm 0,45$  ммоль/л соответственно, в отличие от пациентов без ДР ( $8,23 \pm 0,17$ ) ммоль/л при  $p < 0,001$  (рисунок 15).

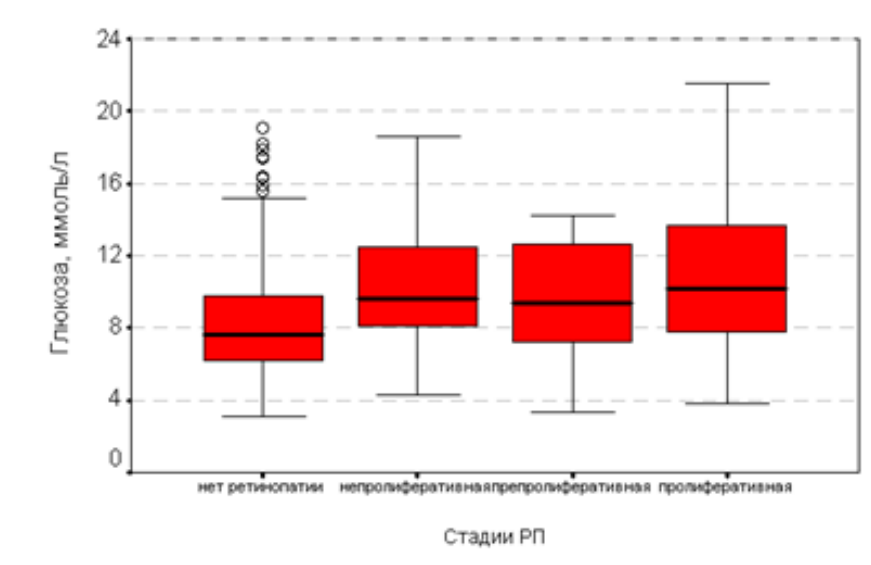


Рисунок 15 – Концентрация глюкозы в крови у пациентов без ДР и с различными стадиями ДР

У пациентов с непролиферативной стадией ДР концентрация глюкозы в крови выше, чем у пациентов с отсутствием ДР, в среднем на 23,9 %, у пациентов с препролиферативной стадией ДР – выше на 19,1 % и с пролиферативной стадией – выше на 33,0 %.

У пациентов с непролиферативной стадией ДР концентрация гликированного гемоглобина была  $8,65 \pm 0,18$  %, с препролиферативной стадией ДР –  $8,58 \pm 0,34$  %, а при пролиферативной стадии ДР –  $8,90 \pm 0,19$  %, что достоверно отличалось ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,015$ ,  $p < 0,001$  соответственно) от пациентов без ДР (концентрация гликированного гемоглобина  $7,37 \pm 0,09$ ) (рисунок 16).

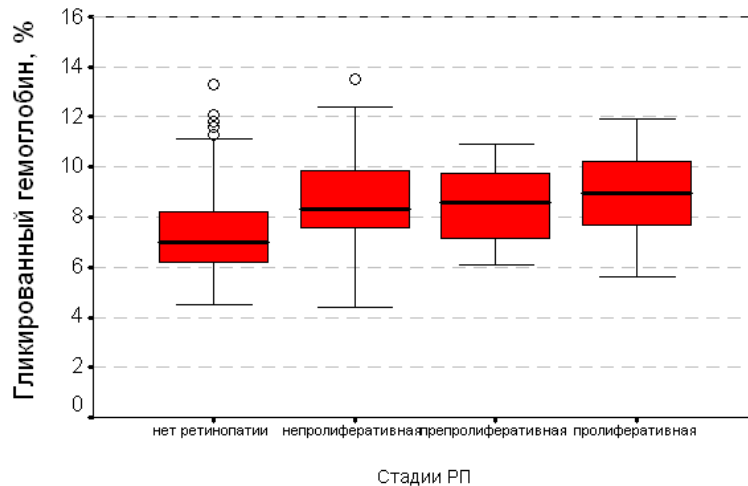


Рисунок 16 – Концентрация гликированного гемоглобина в крови у пациентов без ДР и с различными стадиями ДР

У пациентов с непролиферативной стадией ДР концентрация гликированного гемоглобина в крови выше, чем у пациентов с отсутствием ДР, в среднем на 17,4 %, у пациентов с препролиферативной стадией ДР – выше на 16,4 % и с пролиферативной стадией – выше на 20,8 %.

У пациентов с непролиферативной стадией ДР средний стаж диабета был  $14,47 \pm 0,78$  года, с препролиферативной стадией ДР –  $15,19 \pm 1,78$  года, а при пролиферативной стадии ДР –  $18,14 \pm 0,91$  года, что достоверно отличалось

( $p < 0,001$ ,  $p < 0,014$ ,  $p < 0,001$  соответственно) от пациентов без ДР (стаж диабета  $8,94 \pm 0,43$  года) (рисунок 17).

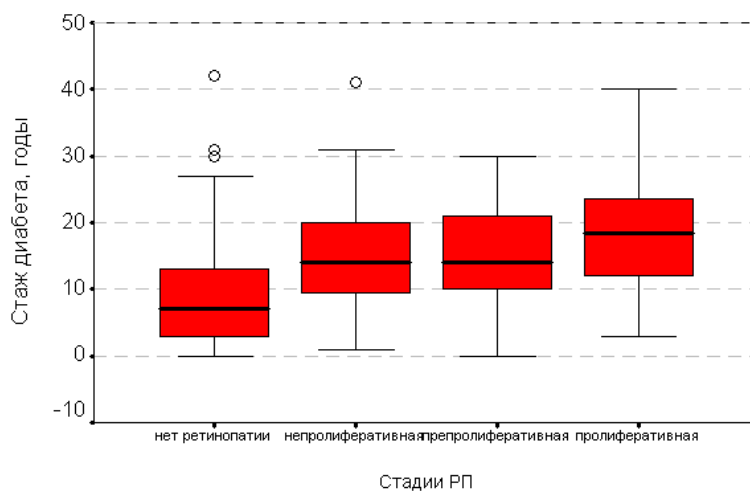


Рисунок 17 – Стаж диабета у пациентов без ДР и с различными стадиями ДР

У пациентов с непролиферативной стадией ДР стаж диабета больше, чем у пациентов с отсутствием ДР, в среднем на 61,9 %, у пациентов с препролиферативной стадией ДР – больше на 69,9 % и с пролиферативной стадией – больше на 102,9 %.

Всем пациентам проведена биомикроскопия хрусталика и стекловидного тела с помощью щелевой лампы, обратная и прямая офтальмоскопия в белом и в бескрасном цвете, последовательно от центра к периферии, во всех меридианах, с тщательным осмотром диска зрительного нерва и макулярной области. При выявлении патологии по показаниям проводили фотографирование глазного дна с помощью фундус-камеры.

Прогрессирование ДР, как правило, происходит последовательно от небольших начальных проявлений до наиболее тяжелой стадии диабетического поражения сетчатки (рисунок 18).



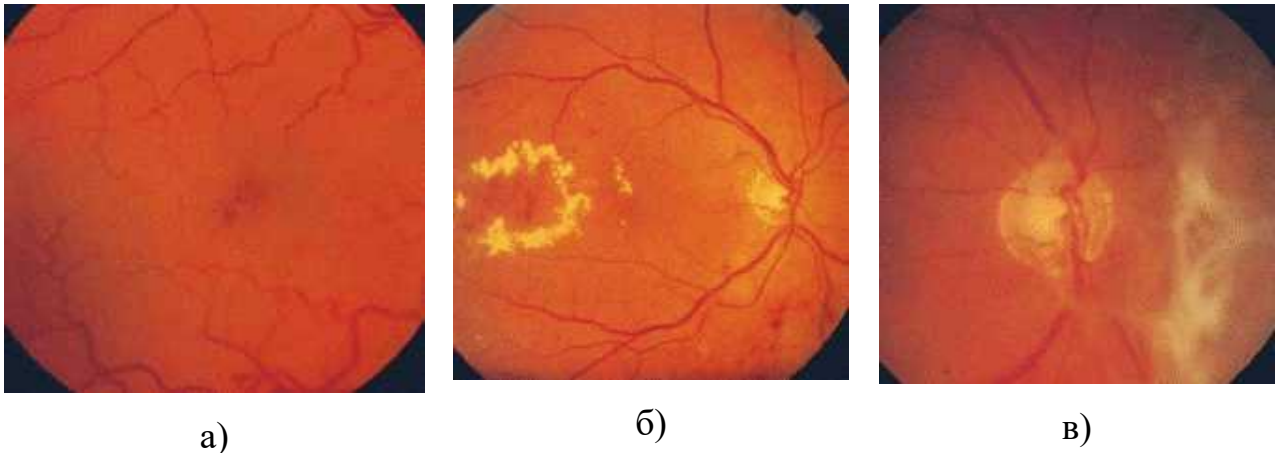


Рисунок 18 – Глазное дно пациентов на различных стадиях ДР:  
 а – диабетическая ангиопатия сетчатки (непролиферативная ДР);  
 б – препролиферативная ДР; в – пролиферативная ДР

При непролиферативной стадии ДР на фотографиях определяется микроангиопатия (истончение стенок капилляров) и макроангиопатия (истончение более крупных сосудов). Для ангиопатии характерно нарушение просвета кровеносных сосудов или их хода: они могут быть сужены, расширены, извиты, полнокровны в зависимости от причины, вызвавшей их изменение. Вследствие этого ухудшается микроциркуляция крови в сосудах глазного дна и, как следствие, возникает гипоксия тканей, множественные кровоизлияния и значительное снижение зрения. Препролиферативная ДР характеризуется наличием венозных аномалий глазного дна, выявляются колебания калибра сосудов, большое количество твердых и «ватобразных» экссудатов, крупных ретинальных геморрагий. При пролиферативной ретинопатии на фотографиях выявляются неоваскуляризация диска зрительного нерва и других отделов сетчатки, кровоизлияния в стекловидное тело, образование фиброзной ткани в области преретинальных кровоизлияний.

Всем пациентам проведена флюоресцентная ангиография глазного дна (ФАГД) (рисунок 19). Установлено, что патологические изменения на глазном дне в основном возникают через 5–10 лет от начала заболевания.



Рисунок 19 – Состояние сосудов сетчатки пациентов с ДР, выявленное с помощью внутривенного контрастирования

У пациентов с диабетической ретинопатией с помощью внутривенного контрастирования сосудов сетчатки установлены флюоресцирующие микроаневризмы и геморрагии, имеющие вид темных пятен, твердый экссудат, отражающий нарушение липидного обмена у пациентов. Мягкий экссудат представляет собой некроз или некробиоз нервных волокон вследствие окклюзии прекапиллярных артериол и свидетельствует о более серьезных нарушениях в сетчатке. Также присутствуют ретинальные геморрагии разного типа в зависимости от местоположения в сетчатке. В пролиферативной стадии ретинальные геморрагии в основном имеют большой размер вследствие повышенной проницаемости неоваскулярных сосудов, а неоваскуляризация приводит к формированию гемофтальмов. Прогрессирование поражения сосудов сетчатки приводит к их окклюзии и появлению неперфузируемых зон сетчатки. Ишемические зоны вырабатывают факторы ангиогенеза, привлекающие в них новообразованные сосуды. Вслед за неоваскуляризацией появляется пролиферация соединительной ткани, возникают тракции, которые приводят к отслойке сетчатки (тракционной и/или регматогенной). Поражение центральной зоны глазного дна протекает в виде диабетического макулярного отека (ДМО) и ишемии макулы.

Наступление препролиферативной стадии ДР является своего рода «точкой невозвращения», когда патологический процесс в глазу начинает развиваться уже по своим законам, часто не зависящим от компенсации метаболических

нарушений СД. Течение СД, начиная с этой стадии, в меньшей степени влияет на данный процесс, как ранее влияло на появление непролиферативной ДР, на этой стадии процесс еще мог быть обратимым.

Также пациентам была проведена оптическая когерентная томография-ангиография (ОКТ-А), с помощью которой возможно неинвазивно и без применения красителя получить изображение ретинальной сосудистой сети тканей глаза. ОКТ-А позволяет визуализировать собственный кровоток. Сосуды с током крови выделяются на снимках отдельным цветом, позволяя четко визуализировать структуру, форму, плотность и занимаемую площадь сосудистой сети, провести качественную и количественную оценку микрокапиллярного кровотока, также можно определить плотность капиллярной сосудистой сети на единицу площади и площадь фовеальной аваскулярной зоны (ФАЗ).

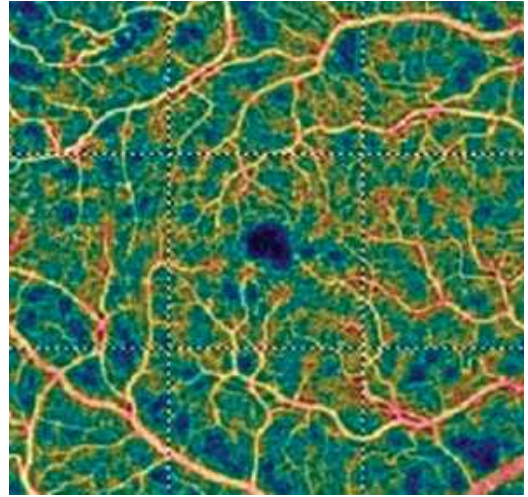
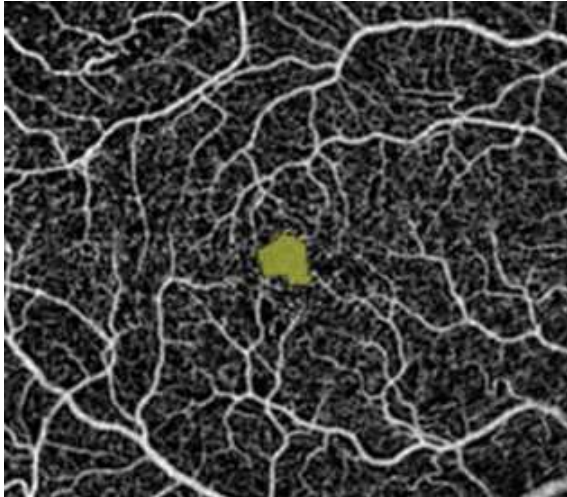
У всех пациентов с СД 2-го типа установлено достоверное снижение плотности кровотока в поверхностной капиллярной сети и расширение ФАЗ по сравнению с контрольными значениями. Также установлено, что у пациентов с СД 2-го типа с разными стадиями диабетической ретинопатии в среднем по группам наблюдалось достоверное расширение ФАЗ – на 28,1–64,4 % выше нормы ( $p < 0,05$ ). Результаты исследования представлены в таблице 13 и на рисунке 20.

Таблица 13 – Размер фовеальной аваскулярной зоны у пациентов с разными стадиями ДР, мм<sup>2</sup>

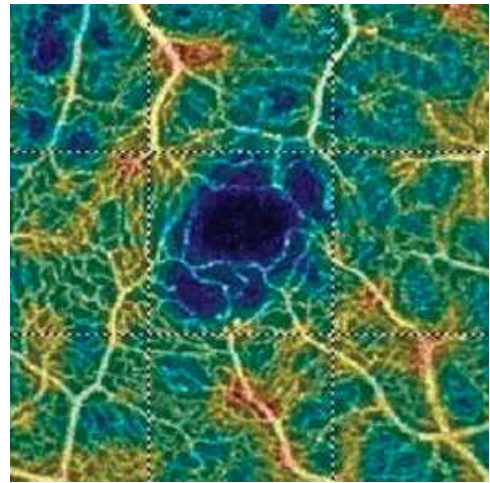
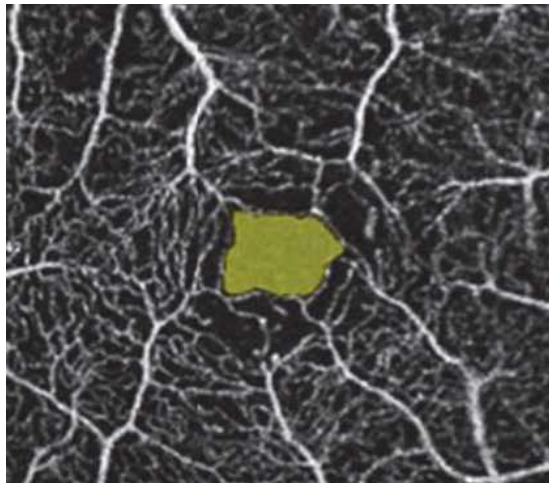
Параметры	СД без ДР	НПДР	преПДР	ПДР	Контрольные значения
Зона сканирования 3×3 (М ± m)	0,35 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,44 ± 0,10	0,36 ± 0,02	0,26 ± 0,02
Минимум	0,28	0,16	0,18	0,07	0,06
Максимум	0,41	0,47	0,81	0,75	0,48

Установлено, что у пациентов с СД 2-го типа наблюдалась разорванность перифовеолярного сосудистого кольца, обеднение перифовеолярного сосудистого

рисунка, а при анализе морфометрических показателей выявлено, что размер ФАЗ обладает значительной индивидуальной изменчивостью. Выявлены пациенты с СД 2-го типа, у которых отмечен малый размер ФАЗ (менее  $0,1 \text{ мм}^2$ ), что является индивидуальной особенностью. В основном у здоровых лиц максимальный размер ФАЗ составляет  $0,48 \text{ мм}^2$ , что в 1,6 раза меньше, чем максимальные размеры ФАЗ у больных ДР.

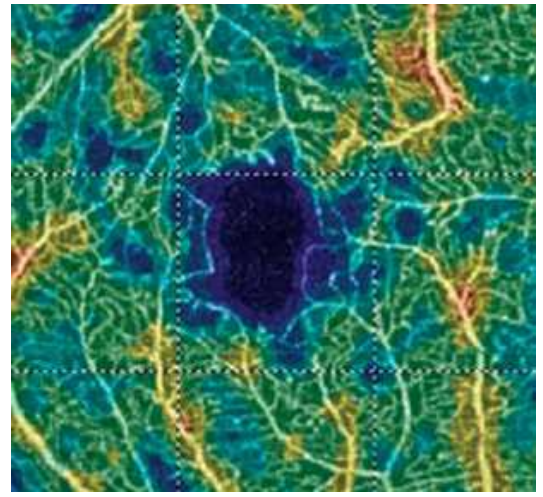
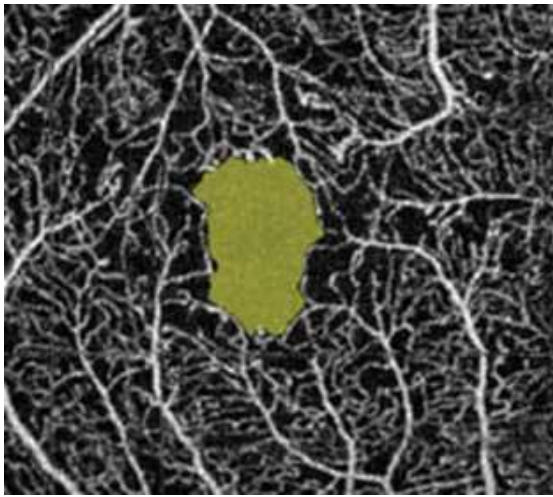


ОКТ-А пациента с СД без ДР (небольшая разорванность перифовеолярного капиллярного кольца, незначительные участки обеднения кровотока во всех квадрантах); площадь ФАЗ –  $0,185 \text{ мм}^2$

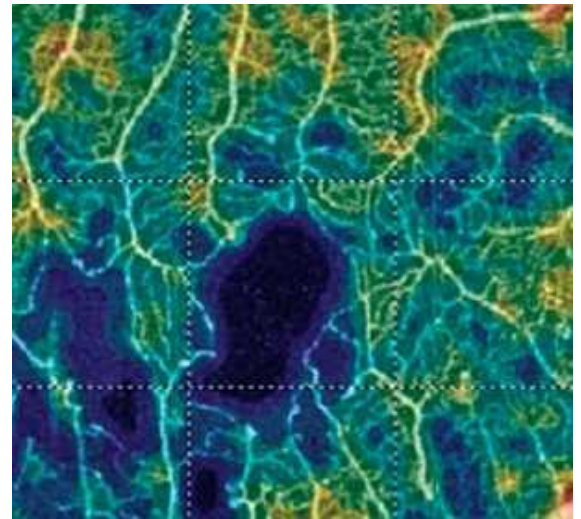
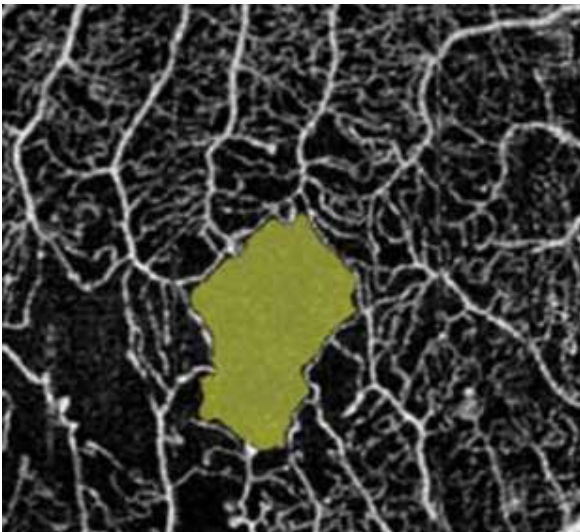


ОКТ-А пациента с НПДР (расширение ФАЗ, обеднение кровотока, преимущественно в зоне fovea и parafovea); площадь ФАЗ –  $0,255 \text{ мм}^2$

Рисунок 20 (начало) – Оценка состояния фовеальной аваскулярной зоны (площадь сканирования –  $3 \times 3 \text{ мм}$ ). Площадь ФАЗ (отмечена желтым цветом на верхних сканах) и карта плотности поверхностного капиллярного сплетения сетчатки (нижние сканы)



ОКТ-А пациента с преПДР (обширное расширение ФАЗ, разорванность перифовеолярного капиллярного кольца, обеднение кровотока в большей степени в зоне fovea и parafovea и в меньшей степени – во всех остальных квадрантах); площадь ФАЗ – 0,398 мм<sup>2</sup>



ОКТ-А пациента с ПДР (выраженное расширение ФАЗ, выраженная разорванность перифовеолярного капиллярного кольца, зоны отсутствия кровотока в зоне fovea и parafovea, в височном, ниже-височном и нижнем квадрантах, обеднение кровотока во всех квадрантах); площадь ФАЗ – 0,532 мм<sup>2</sup>

Рисунок 20 (окончание) – Оценка состояния фовеальной аваскулярной зоны (площадь сканирования – 3×3 мм). Площадь ФАЗ (отмечена желтым цветом на верхних сканах) и карта плотности поверхностного капиллярного сплетения сетчатки (нижние сканы)

Исследование в режиме Angio Retina площадью сканирования 3×3 мм (таблица 14) выявило, что в группе пациентов с СД без ДР и НПДР снижение плотности было менее выраженным и составляло в среднем 4–4,4 % по сравнению с контролем.

Таблица 14 – Плотность кровотока в макулярной зоне у больных СД и на разных стадиях ДР (%), площадь сканирования 3×3 мм

Зоны исследования	Без ДР	НПДР	преПДР	ПДР	Контрольные значения
Верхне-височный	54,56 ± 0,40 (1,53 %)¹	53,96 ± 0,93 (2,67 %)¹	46,75 ± 1,92 (16,7 %)¹	47,83 ± 0,51 (13,73 %)¹	55,42 ± 0,39
Верхний	56,44 ± 0,46 (2,75 %)¹	55,62 ± 1,07 (4,20 %)¹	47,12 ± 1,36 (18,8 %)¹	49,14 ± 0,72 (15,33 %)¹	58,04 ± 0,37
Верхне-носовой	56,33 ± 0,62 (3,23 %)¹	55,96 ± 0,83 (3,83 %)¹	48,06 ± 1,73 (17,44 %)¹	49,94 ± 0,61 (14,21 %)¹	58,21 ± 0,36
Носовой	53,97 ± 0,42 (5,10)¹	53,96 ± 0,76 (5,15)¹	47,86 ± 1,55 (15,87)¹	46,79 ± 0,74 (17,75)¹	56,89 ± 0,34
Центральный	30,99 ± 1,36 (14,73 %)¹	32,56 ± 1,14 (10,38)¹	30,24 ± 1,73 (16,71 %)¹	30,54 ± 0,64 (15,88 %)¹	36,33 ± 0,62
Височный	52,92 ± 0,28 (3,71 %)¹	53,13 ± 0,94 (3,33 %)¹	46,14 ± 1,82 (16,05 %)¹	45,86 ± 0,86 (16,54 %)¹	54,95 ± 0,35
Нижне-височный	55,26 ± 0,44 (0,73 %)¹	53,44 ± 0,95 (3,97 %)¹	46,92 ± 1,73 (18,65 %)¹	47,06 ± 0,75 (15,47)¹	55,67 ± 0,36
Нижний	56,59 ± 0,42 (2,34 %)¹	55,76 ± 0,93 (3,78 %)¹	47,26 ± 2,09 (18,45 %)¹	47,58 ± 0,74 (17,86 %)¹	57,95 ± 0,32
Нижне-носовой	57,36 ± 0,52 (0,67 %)¹	55,53 ± 0,85 (3,84 %)¹	49,74 ± 1,94 (13,90 %)¹	50,18 ± 0,62 (13,11 %)¹	57,77 ± 0,43
Зона фовеа + парафовеа	52,79 ± 0,25 (3,38 %)¹	52,29 ± 0,63 (4,28 %)¹	45,55 ± 1,56 (16,63 %)¹	46,16 ± 0,55 (15,52 %)¹	54,64 ± 0,25
Зона фовеа	25,62 ± 1,51 (19,31 %)¹	28,66 ± 1,24 (9,74 %)¹	26,76 ± 1,81 (15,75 %)¹	27,47 ± 0,68 (13,52 %)¹	31,75 ± 0,76
Зона парафовеа	55,56 ± 0,37 (2,41 %)¹	54,52 ± 0,73 (4,27 %)¹	47,23 ± 1,59 (17,09 %)¹	47,28 ± 0,63 (16,94 %)¹	56,96 ± 0,25

Примечание: ¹ – процент снижения плотности кровотока в данной группе по отношению к группе контроля.

Анализ данных по квадрантам выявил, что максимальные изменения наблюдаются в центральном квадранте и в зоне fovea. В группах пациентов с

преПДР и ПДР изменения были более значительными: среднее снижение плотности кровотока составляло 16,6 % и 15,7 % соответственно, причем отмечалось равномерное снижение плотности кровотока по всем квадрантам. Различия по сравнению с нормой высокодостоверны ( $p < 0,05$ ) для всех групп, а также при сравнении групп СД без ДР и НПДР с группами преПДР и ПДР. Между группами СД без ДР и НПДР и между группами преПДР и ПДР статистически значимых различий не выявлено.

При площади сканирования  $3 \times 3$  мм снижение плотности кровотока в центральном квадранте и в зоне fovea связано с увеличением размера ФАЗ, которое наблюдается уже на ранних стадиях ДР и даже при СД без ДР. При преПДР и ПДР изменения более выражены и распространены по всем квадрантам анализируемой зоны.

Таким образом, метод ОКТ-А позволяет эффективно выявлять микрососудистые изменения в макулярной зоне при СД даже на самых ранних стадиях заболевания, когда на глазном дне еще отсутствуют проявления ДР. Установлено, что наиболее ранним маркером изменений микроциркуляторного русла сетчатки при СД являются качественные и количественные изменения в ФАЗ, которые выявляются еще на доклинических стадиях развития ДР и увеличиваются по мере прогрессирования заболевания, а также снижение плотности капиллярной сети поверхностного сосудистого сплетения.

### **3.1.1 Анализ у пациентов частот мутаций генов, ассоциированных с диабетической ретинопатией**

Для анализа взаимосвязей генотипов пациентов с наличием или отсутствием ДР нами проведено исследование для проверки гипотезы доминирования того или иного аллеля и расчет уровня значимости каждого аллеля по критериям хи-квадрат и отношения шансов.

## Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена VEGF rs2010963

В таблице 15 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата VEGF rs2010963 и наличием ДР.

Таблица 15 – Взаимосвязь между полиморфными участками гена VEGF rs2010963 и наличием ДР

Генотип VEGF rs2010963	Нет ДР, n = 272		Есть ДР, n = 203		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 C/C	89	32,72	63	31,0	1	0,15	0,926
Гетерозигота G/C	108	39,71	83	40,9	1,09 (0,71–1,67)		
Гомозигота 2 G/G	75	27,57	57	28,1	1,07 (0,67–1,72)		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	89	32,7	63	31,0	1	0,15	0,697
Гетерозигота + гомозигота 2	183	67,3	140	69,0	1,08 (0,73–1,6)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота	197	72,4	146	71,9	1	0,02	0,903
Гомозигота 2	75	27,6	57	28,1	1,03 (0,68–1,54)		

По данным, представленным в таблице, можно рассчитать теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычислить их доли и сопоставить с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

Наблюдаемые аллели C:  $89 + 89 + 108 + 63 + 63 + 83 = 495$ .

Наблюдаемые аллели G:  $108 + 75 + 75 + 83 + 57 + 57 = 455$ .

Всего:  $C + G = 495 + 455 = 950$ .

Доля C =  $495/950 = 0,521$ .

Доля G =  $455/950 = 0,479$ .



Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$ , где в роли  $a$  и  $b$  подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$$CC = 0,521^2 = 0,271 = 27,2 \%$$

$$GC = 2 * 0,521 * 0,479 = 0,499 = 49,9 \%$$

$$GG = 0,479^2 = 0,229 = 22,9 \%$$

Теоретически именно с рассчитанной частотой должны были бы встречаться изучаемые генотипы в популяции, однако с фактическими данными теоретические расчеты не совпали.

	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Общая группа				
Гомозигота 1	152	32,0	129	27,2
Гетерозигота	191	40,2	237	49,9
Гомозигота 2	132	27,8	109	22,9

$$\chi^2 = 17,9, p < 0,001.$$

При исследовании гена VEGF rs2010963 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке не соответствует равновесию Харди-Вайнберга ни у пациентов с наличием, ни с отсутствием диабетической ретинопатии, ни среди всех обследованных.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: CC – 152 чел. (32,0 %), GC – 191 чел. (40,2 %) и GG – 132 чел. (27,8 %). Это соответствует частотам аллелей C – 52,1 % и G – 47,9 % и соответственно теоретическому распределению генотипов CC/GC/GG – 27,2 %/49,9 %/22,9 %, что статистически значимо отличается от наблюдаемых частот ( $\chi^2 = 17,9, p < 0,001$ ). Меньшая почти на 10 %, чем теоретически ожидаемая частота гетерозигот по гену VEGF в изучаемой группе больных, на наш взгляд, может быть связана с неслучайным отбором генотипов при формировании изучаемых групп больных сахарным диабетом из общей популяции.

### Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена ADRB3 rs4994

В таблице 16 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата ADRB3 rs4994 и наличием ДР.

Таблица 16 – Взаимосвязь между полиморфными участками гена ADRB3 rs4994 и наличием ДР

Генотип ADRB3 rs4994	Нет ДР		Есть ДР		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%	Референс – 1-й аллель		
Гомозигота 1 Т/Т	218	80,15	162	79,8	1	1,564	0,458
Гетерозигота Т/С	52	19,12	41	20,2	1,06 (0,67–1,68)		
Гомозигота 2 С/С	2	0,74	0	0,0	–		
Итого	272	100	203	100	–		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 Т/Т	218	80,1	162	79,8	1	0,009	0,926
Гетерозигота + гомозигота 2 (Т/С + С/С)	54	19,9	41	20,2	1,02 (0,65–1,61)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота (Т/Т+ Т/С)	270	99,3	203	100,0	1	1,499	0,221
Гомозигота 2 (С/С)	2	0,7	0	0,0	–		

По данным, представленным в таблице, также рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

Наблюдаемые аллели Т:  $218 + 218 + 52 + 162 + 162 + 41 = 853$ .

Наблюдаемые аллели С:  $52 + 2 + 2 + 41 + 0 + 0 = 97$ .

Всего:  $T + C = 853 + 97 = 950$ .

Доля Т =  $853/950 = 0,898$ .

Доля С =  $97/950 = 0,102$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$ , где в роли  $a$  и  $b$  подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$$TT = 0,898^2 = 0,806 = 80,6 \%$$

$$TC = 2 * 0,898 * 0,102 = 0,183 = 18,3 \%$$

$$CC = 0,102^2 = 0,010 = 1,1 \%$$

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных.

	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Общая группа				
Гомозигота 1	380	80,0	383	80,6
Гетерозигота	93	19,6	87	18,3
Гомозигота 2	2	0,4	5	1,1

При исследовании гена ADRB3 rs4994 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди-Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: TT – 380 чел. (80,0 %), TC – 93 чел. (19,6 %) и CC – 2 чел. (0,4 %). Это соответствует частотам аллелей T – 89,8 % и C – 10,2 % и соответственно теоретическому распределению генотипов TT/TC/CC – 80,6 %/18,3 %/1,1 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

Необходимо отметить, что редкий аллель гена ADRB3 в позиции rs4994 у изученной группы больных встречался лишь у 10 % пациентов, что соответствует теоретической частоте гомозигот в популяции порядка 1 %. Это статистически неотличимо от наблюдаемых больных из обеих групп с носителями генотипа CC. Если данный генотип и имел неблагоприятное прогностическое влияние на риск развития ретинопатии, то при данном объеме исследования его невозможно было доказать.

### Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена ITGA2 rs2910964

В таблице 17 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата ITGA2 rs2910964 и наличием ДР.

Таблица 17 – Взаимосвязь между полиморфными участками гена ITGA2 rs2910964 и наличием ДР

Генотип ITGA2 rs2910964	Нет ДР		Есть ДР		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%	Референс – 1-й аллель		
Гомозигота 1 С/С	94	34,56	72	35,5	1	0,142	0,932
Гетерозигота С/Т	134	49,26	97	47,8	0,95 (0,63–1,41)		
Гомозигота 2 Т/Т	44	16,18	34	16,7	1,03 (0,6–1,78)		
Итого	272	100	203	100	–	–	–
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 С/С	94	34,7	72	35,5	1	0,031	0,860
Гетерозигота + гомозигота 2 (С/Т+Т/Т)	177	65,3	131	64,5	0,97 (0,66–1,41)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота (С/С+С/Т)	228	84,1	169	83,3	1	0,066	0,797
Гомозигота 2 Т/Т	43	15,9	34	16,7	1,07 (0,65–1,74)		

По данным, представленным в таблице, также рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

Наблюдаемые аллели С:  $94 + 94 + 134 + 72 + 72 + 97 = 563$ .

Наблюдаемые аллели Т:  $134 + 44 + 44 + 97 + 34 + 34 = 387$ .

Всего:  $C + T = 563 + 387 = 950$ .

Доля С =  $563/950 = 0,592$ .

Доля Т =  $387/950 = 0,408$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$ , где в роли а и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$$CC = 0,592^2 = 0,350 = 35,0 \%$$

$$CT = 2 * 0,592 * 0,408 = 0,483 = 48,3 \%$$

$$TT = 0,408^2 = 0,167 = 16,7 \%$$

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных.

	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Общая группа				
Гомозигота 1	166	34,9	166	35,0
Гетерозигота	231	48,6	229	48,3
Гомозигота 2	78	16,4	80	16,7

При исследовании гена ITGA2 rs2910964 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди-Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: CC – 166 чел. (34,9 %), CT – 231 чел. (48,6 %) и TT – 78 чел. (16,4 %). Это соответствует частотам аллелей С – 59,2 % и Т – 40,8 % и соответственно теоретическому распределению генотипов CC/CT/TT – 35,0 %/48,3 %/16,7 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

Следует отметить, что взаимосвязи генотипов по данному гену не выявлено во всех вариантах рассмотрения при  $p \gg 0,005$ .

## Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена AKR1B1 rs759853

В таблице 18 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата AKR1B1 rs759853 и наличием ДР.

Таблица 18 – Взаимосвязь между полиморфными участками гена AKR1B1 rs759853 и наличием ДР

Генотип AKR1B1 rs759853	Нет ДР, n = 272		Есть ДР, n = 203		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 G/G	104	38,24	73	36,0	1	1,482	0,477
Гетерозигота G/A	132	48,53	95	46,8	1,03 (0,69–1,53)		
Гомозигота 2 A/A	36	13,24	35	17,2	1,39 (0,8–2,41)		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	104	38,2	73	36,0	1	0,257	0,612
Гетерозигота + гомозигота 2	168	61,8	130	64,0	1,1 (0,76–1,61)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + Гетерозигота	236	86,8	168	82,8	1	1,467	0,226
Гомозигота 2	36	13,2	35	17,2	1,37 (0,82–2,26)		

По данным, представленным в таблице, также рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

Наблюдаемые аллели G:  $104 + 104 + 132 + 73 + 73 + 95 = 581$ .

Наблюдаемые аллели A:  $132 + 36 + 36 + 95 + 35 + 35 = 369$ .

Всего:  $G + A = 581 + 369 = 950$ .

Доля G =  $581/950 = 0,612$ .

Доля A =  $369/950 = 0,388$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$ , где в роли a и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$$GG = 0,612^2 = 0,375 = 37,5 \%$$

$$GA = 2 \cdot 0,612 \cdot 0,388 = 0,475 = 47,5 \%$$

$$AA = 0,388^2 = 0,150 = 15,0 \%$$

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных.

	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Общая группа				
Гомозигота 1	177	37,3	178	37,5
Гетерозигота	227	47,8	226	47,5
Гомозигота 2	71	14,9	71	15,0

При исследовании гена AKR1B1 rs759853 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди-Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: GG – 177 чел. (37,3 %), GA – 227 чел. (47,8 %) и AA – 71 чел. (14,9 %). Это соответствует частотам аллелей G – 61,2 % и A – 38,8 % и соответственно теоретическому распределению генотипов GG/GA/AA – 37,5 %/47,55 %/15,0 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

### **Характеристика распределения генотипов полиморфных участков гена APOE rs7412 и rs429358**

Исследование гена APOE мы проводили в двух участках rs7412 и rs429358. В таблице 19 приведен анализ сопряженности между полиморфным участком rs7412 гена-кандидата APOE и наличием ДР.

Таблица 19 – Взаимосвязь между полиморфными участками гена АРОЕ rs7412 и наличием ДР

Генотип АРОЕ rs7412	Нет ДР, n = 272		Есть ДР, n = 203		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 С/С	229	84,19	169	83,3	1	0,134	0,935
Гетерозигота С/Т	41	15,07	32	15,8	1,06 (0,64–1,75)		
Гомозигота 2 Т/Т	2	0,74	2	1,0	1,36 (0,19–9,72)		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (I-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	229	84,2	169	83,3	1	0,076	0,783
Гетерозигота + гомозигота 2	43	15,8	34	16,7	1,07 (0,66–1,75)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (I-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота	270	99,3	201	99,0	1	0,087	0,768
Гомозигота 2	2	0,7	2	1,0	1,34 (0,19–9,62)		

Также по табличным данным рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка rs7412 гена АРОЕ, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

Наблюдаемые аллели С:  $229 + 229 + 41 + 169 + 169 + 32 = 869$ .

Наблюдаемые аллели Т:  $41 + 2 + 2 + 32 + 2 + 2 = 81$ .

Всего:  $C + T = 869 + 81 = 950$ .

Доля С =  $869/950 = 0,915$ .

Доля Т =  $81/950 = 0,085$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$ , где в роли а и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$CC = 0,915^2 = 0,837 = 83,7 \%$

$CT = 2 * 0,915 * 0,085 = 0,156 = 15,6 \%$

$TT = 0,085^2 = 0,007 = 0,7 \%$



Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных.

	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Общая группа	398	83,8	398	83,7
Гомозигота 1	398	83,8	398	83,7
Гетерозигота	73	15,4	74	15,6
Гомозигота 2	4	0,8	3	0,7

При исследовании участка rs7412 гена APOE установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди-Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: СС – 398 чел. (83,8 %), СТ – 73 чел. (15,4 %) и ТТ – 4 чел. (0,8 %). Это соответствует частотам аллелей С – 91,5 % и Т – 8,5 % и соответственно теоретическому распределению генотипов СС/СТ/ТТ – 83,7 %/15,6 %/0,7 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

По аналогичной схеме проведен анализ участка rs429358 гена APOE (таблица 20).

Таблица 20 – Взаимосвязь между полиморфными участками гена APOE rs429358 и наличием ДР

Генотип APOE rs429358	Нет ДР, n = 272		Есть ДР, n = 203		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 Т/Т	204	75,00	160	78,8	1	0,95	0,622
Гетерозигота Т/С	65	23,90	41	20,2	0,8 (0,52–1,25)		
Гомозигота 2 С/С	3	1,10	2	1,0	0,85 (0,14–5,15)		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	204	75,0	160	78,8	1	0,946	0,331
Гетерозигота +гомозигота 2	68	25,0	43	21,2	0,81 (0,52–1,24)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота	269	98,9	201	99,0	1	0,015	0,901
Гомозигота 2	3	1,1	2	1,0	0,89 (0,15–5,39)		

Также по табличным данным рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка rs429358 гена APOE, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

Наблюдаемые аллели T:  $204 + 204 + 65 + 160 + 160 + 41 = 834$ .

Наблюдаемые аллели C:  $65 + 3 + 3 + 41 + 2 + 2 = 116$ .

Всего:  $T + C = 834 + 116 = 950$ .

Доля C =  $834/950 = 0,878$ .

Доля T =  $116/950 = 0,122$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$ , где в роли a и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$TT = 0,878^2 = 0,771 = 77,1 \%$

$TC = 2 * 0,878 * 0,122 = 0,214 = 21,4 \%$

$CC = 0,122^2 = 0,015 = 1,5 \%$

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных.

	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Общая группа				
Гомозигота 1	364	76,6	366	77,1
Гетерозигота	106	22,3	102	21,4
Гомозигота 2	5	1,1	7	1,5

При исследовании участка rs429358 гена APOE установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди-Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: TT – 364 чел. (76,6 %), TC – 106 чел. (22,3 %) и CC – 5 чел. (11 %). Это соответствует частотам

аллелей Т – 87,8 % и С – 12,2 % и соответственно теоретическому распределению генотипов ТТ/ТС/СС – 77,1 %/21,4 %/1,5 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

Таким образом, в настоящее время принято считать, что патогенез диабета является многофакторным, но генетические факторы риска играют в нем фундаментальную роль. Недавние исследования в области генома выявили несколько генетических локусов, участвующих в патогенезе как диабета 1-го типа, так и диабета 2-го типа. Установлено, что механизмы патогенеза диабетической ретинопатии разнообразны и достаточно сложны, однако немаловажную роль в них играют генетические факторы, которые, вероятно, определяют восприимчивость пациента к этой болезни, а также различия в частоте диабетической ретинопатии между индивидуумами с диабетом 1-го типа и 2-го типа.

Длительность диабета и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии ретинопатии. Однако эти факторы сами по себе не объясняют возникновение сосудистых осложнений. Кроме того, у ряда пациентов с плохим гликемическим контролем даже за большой промежуток времени ретинопатия не развивается, в то время как у некоторых пациентов с хорошим гликемическим контролем ретинопатия развивается уже в течение нескольких лет. В этой связи предполагается важная роль генетических факторов в развитии диабетической ретинопатии.

В ходе нашего исследования установлено, что полиморфные локусы генов VEGF rs2010963, AKR1B1 rs759853, ITGA2 rs2910964, ADRB3 rs4994, APOE rs7412, APOE 429358, рассматриваемые независимо друг от друга, не связаны с развитием диабетической ретинопатии в изученной группе больных сахарным диабетом 2-го типа, что, возможно, связано с различными механизмами его компенсации.

### 3.2 Межгенные взаимодействия как фактор развития диабетической ретинопатии

Отсутствие статистически значимых взаимосвязей между отдельными генотипами в полиморфных участках генов определило дальнейший поиск межгенных взаимодействий, которые могли бы увеличить или, наоборот, снизить риски развития диабетической ретинопатии. Для поиска благоприятных и неблагоприятных комбинаций генов использовали метод MDR, который не предполагает никакой генетической модели и не оценивает какие-либо параметры, а только выбирает наиболее тесно связанные с исходом сочетания генов и генотипов.

В анализе использовались все 475 наблюдений без фильтрации по национальному признаку. Для прогнозирования риска развития ДР классификатором было предложено два варианта – по сочетанию двух генов и трех генов.

Первоначально программой было вычленено сочетание распределения генотипов полиморфных участков генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 (рисунок 21).

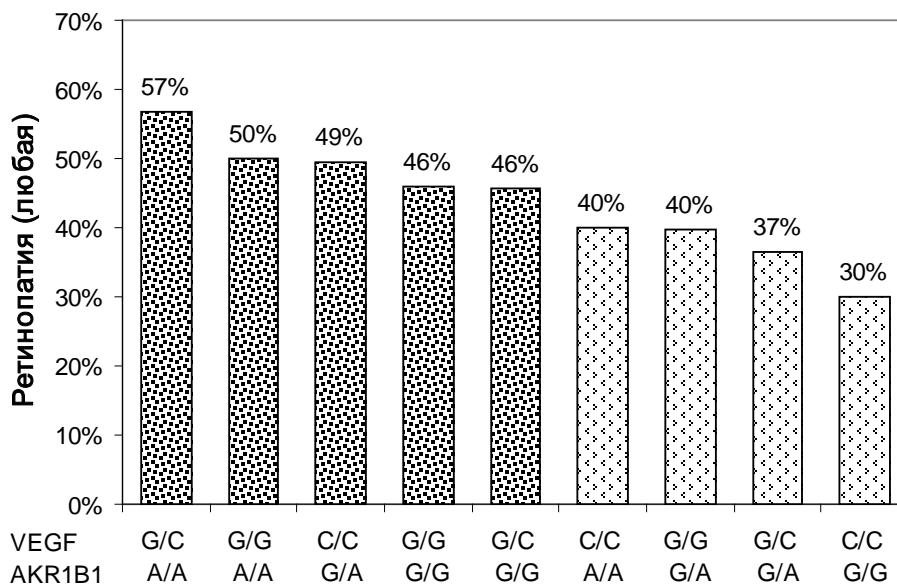


Рисунок 21 – Доля больных с диабетической ретинопатией при различных генотипах по полиморфным локусам генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 (темной штриховкой отмечены классифицированные как положительные, светлой – как отрицательные)

По данным рисунка 21 установлено, что крайние варианты – два самых левых столбика – это сочетания гомозиготы по более редкому варианту гена AKR1B1 с гетерозиготой по редкому варианту гена VEGF (57 %) или гомозиготой гена VEGF (50 %) имеются у пациентов с наличием диабетической ретинопатии. И наоборот, реже всего ДР развивалась у носителей «диких» вариантов полиморфизмов по двум генам одновременно: VEGF и AKR1B1 (самый правый столбик – 30 % пациентов с ДР). Невысокие частоты диабетической ретинопатии также наблюдали и при одновременном сочетании двух гетерозиготных вариантов генов VEGF и AKR1B1 (37 %).

При оценке качества данного прогноза было установлено, что точность метода составляет 55,6 %, чувствительность – 59,6 %, специфичность – 52,6 %, отношение шансов 1,64 (1,13–2,36);  $\chi^2$  – 6,917 ( $p = 0,0085$ );  $\chi^2$  (попр. Йетса) – 6,437 ( $p = 0,011$ ); Карра – 0,12.

Данные характеристики не являются достаточными, поэтому мы продолжили прогностический поиск, используя сочетание распределения генотипов полиморфных участков трех генов: VEGF rs2010963; AKR1B1 rs759853; APOE участок rs7412 и участок rs429358 (рисунок 22).

Так как оба участка гена APOE (rs7412 и rs429358) рассматривались вместе, мы ввели кодирование сочетаний генотипов (таблица 21).

Таблица 21 – Обозначение нуклеотидами объединенных участков гена APOE

Обозначение нуклеотидами		
АРОЕ rs7412	АРОЕ rs429358	АРОЕ объединенный
Т/Т	Т/Т	e2e2
С/Т	Т/Т	e2e3
С/С	Т/Т	e3e3
С/С	Т/С	e3e4
С/С	С/С	e4e4
С/Т	Т/С	гетерозиготы

В участке гена АРОЕ rs7412 аллель С – дикий, более часто встречающийся.

В участке гена АРОЕ rs7412 аллель Т – дикий, более часто встречающийся.

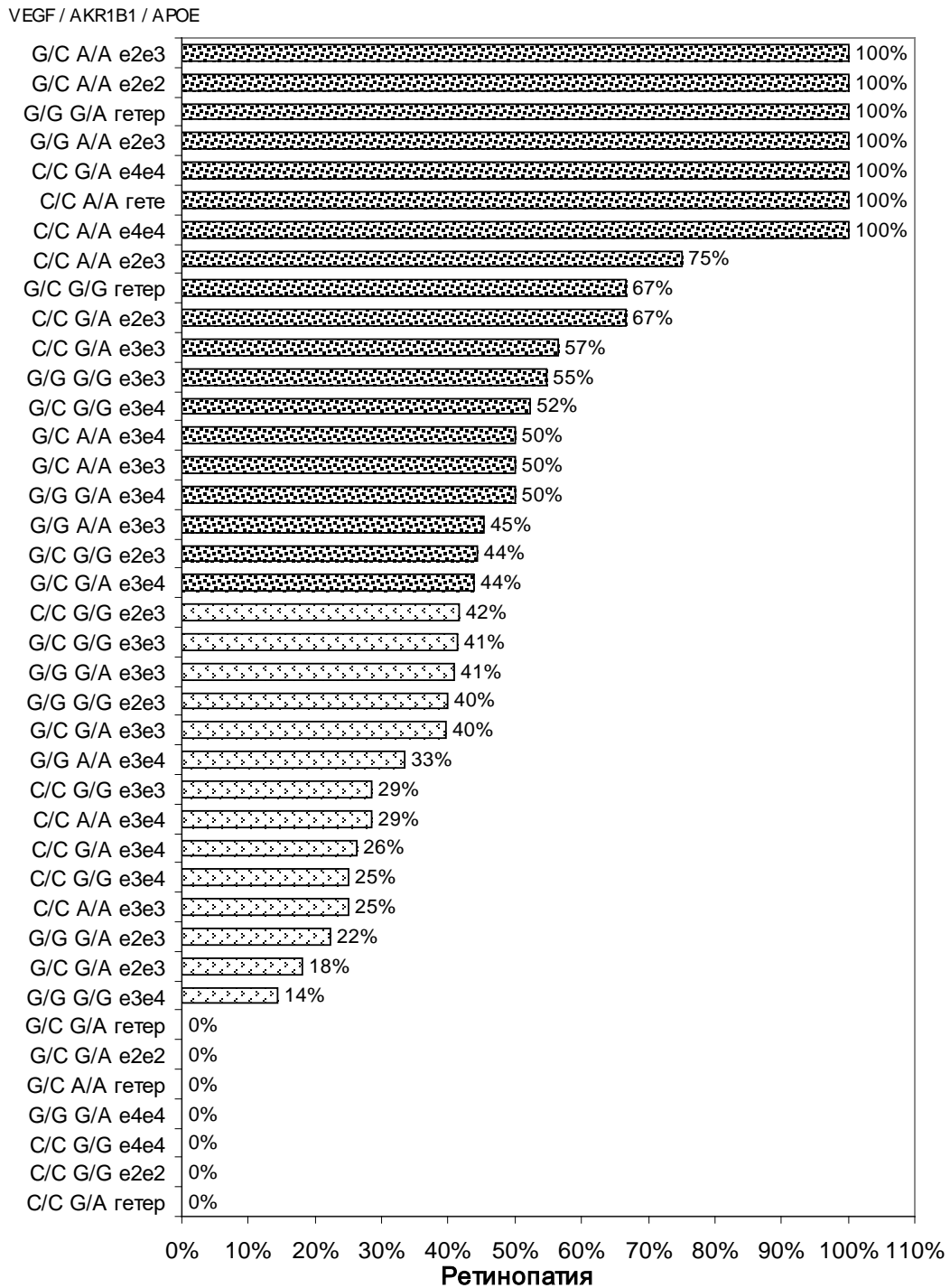


Рисунок 22 – Доля больных с ретинопатией (любой стадии) при различных генотипах по полиморфным локусам генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 и АРОЕ (темной штриховкой отмечены классифицированные как положительные, светлой – как отрицательные)

По данным рисунка 22 установлено, что некоторые сочетания генотипов участков трех генов определяют 100 % развития диабетической ретинопатии:

- 1) сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3;
- 2) сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2;
- 3) сочетание гомозиготы по редкому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- 4) сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3;
- 5) сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4;
- 6) сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- 7) сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4.

При этом также установлены сочетания генотипов участков трех генов, определяющие отсутствие диабетической ретинопатии:

- 1) сочетание гетерозиготы VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- 2) сочетание гетерозиготы VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2;
- 3) сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- 4) сочетание гомозиготы по редкому типу VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4;
- 5) сочетание гомозиготы по дикому типу VEGF с гомозиготой по дикому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4;
- 6) сочетание гомозиготы по дикому типу VEGF с гомозиготой по дикому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2;

7) сочетание гомозиготы по дикому типу VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы.

При оценке качества данного прогноза было установлено, что точность метода составляет 62,0 %, чувствительность – 54,0 %, специфичность – 68 %, отношение шансов 2,52 (1,73–3,66);  $\chi^2$  – 23,6 ( $p = 0,001$ );  $\chi^2$  (попр. Йетса) – 22,7 ( $p = 0,001$ ); Карра – 0,23.

Полученные характеристики мы посчитали недостаточными и для дальнейшего улучшения прогноза риска развития диабетической ретинопатии воспользовались множественной логистической регрессией с пошаговым включением или исключением предикторов (предсказывающих переменных). В качестве возможных факторов риска рассматривали клинико-лабораторные данные пациентов (остроту зрения, внутриглазное давление, концентрации холестерина, триглицеридов, глюкозы, гликированного гемоглобина, величину АД, ИМТ, стаж диабета). С помощью метода MDR было установлено, что наиболее значимыми параметрами для развития ДР являются концентрация гликированного гемоглобина в крови, концентрация глюкозы в крови и стаж диабета.

На основе установленных данных нами были получены три устойчивые модели, включающие выработанные программой MDR комбинации генотипов (две модели с сочетанием трех генотипов и одна модель с сочетанием двух генотипов), стаж сахарного диабета и уровень гликемии, оцененный либо по гликированному гемоглобину, либо по уровню глюкозы (таблица 22).

Такие возможные факторы риска, как возраст, индекс массы тела, артериальное давление, показатели липидного обмена также были в числе потенциальных предикторов, однако ни в одну итоговую многомерную модель не вошли.



Таблица 22 – Модели множественной логистической регрессии для оценки развития ДР с учетом факторов риска

Предиктор	Коэффициент регрессии, b	Отношение шансов (95 % ДИ)	p
<i>Модель 1</i>			
Классификатор по трем генам gen1z – VEGF; gen3z – AKR1B1; gen7z – APOE	0,99	2,70 (1,71–4,27)	< 0,001
Гликированный гемоглобин, %	0,48	1,62 (1,41–1,87)	< 0,001
Стаж диабета, годы	0,11	1,11 (1,08–1,15)	< 0,001
Константа	–5,96	–	< 0,001
<i>Модель 2</i>			
Классификатор по трем генам gen1z – VEGF; gen3z – AKR1B1; gen7z – APOE	0,85	2,33 (1,50–3,61)	< 0,001
Глюкоза, ммоль/л	0,21	1,23 (1,15–1,32)	< 0,001
Стаж диабета, годы	0,12	1,12 (1,09–1,16)	< 0,001
Константа	–3,98	–	< 0,001
<i>Модель 3</i>			
Классификатор по двум генам gen1z – VEGF; gen3z – AKR1B1	0,48	1,61 (1,03–2,51)	0,035
Глюкоза	0,08	1,09 (1,00–1,19)	0,050
Гликированный гемоглобин %	0,37	1,45 (1,22–1,71)	< 0,001
Стаж диабета, годы	0,11	1,11 (1,08–1,15)	< 0,001
Константа	–5,66	–	< 0,001

Для модели 1 качество прогнозирования при пороговой вероятности (cut off) = 0,4 имеет чувствительность 74 %, специфичность – 74 %. Для модели 2 чувствительность составила 73 %, специфичность – 72 %. Модель 3 с учетом двух генов, стажа диабета, а также концентрации гликированного гемоглобина и глюкозы в крови имеет чувствительность 78 %, специфичность – 74 %.

Таким образом, дополнительный учет концентрации гликированного гемоглобина и глюкозы в крови, а также стажа заболевания сахарным диабетом, помимо комбинации неблагоприятных генотипов по полиморфным участкам

генов, позволяет улучшить точность прогноза развития диабетической ретинопатии. В частности, повысилась чувствительность метода с 54 % при прогнозировании только по генетической предрасположенности до 74 % при учете комплекса факторов (генетическая предрасположенность + гипергликемия + стаж сахарного диабета).

Особого внимания заслуживает тот факт, что при использовании классификатора только по двум генам качество прогнозирования было худшим, но, однако, при использовании его в комплексе с другими факторами риска (стаж сахарного диабета, концентрация глюкозы и гликированного гемоглобина в крови), полученные чувствительность и специфичность существенно повысились и даже стали более высокими, чем в модели по трем генам. По сравнению только с генетическим прогнозом существенно возросли и чувствительность (с 59,6 % до 78,0 %), и специфичность (с 52,6 % до 74,0 %).

Несомненно, основной предиктор – это стаж сахарного диабета, но и генетическая предрасположенность играет статистически значимую роль. Возможно, именно факторы наследственности влияют на особенности течения сахарного диабета и его клинические проявления в целом в организме.

Для дальнейшей оценки качества полученных моделей логистической регрессии и отдельных факторов риска, входящих в ее состав, применили ROC-анализ.

Анализ первой модели логистической регрессии с помощью ROC-анализа представлен на рисунке 23 и в таблице 23.

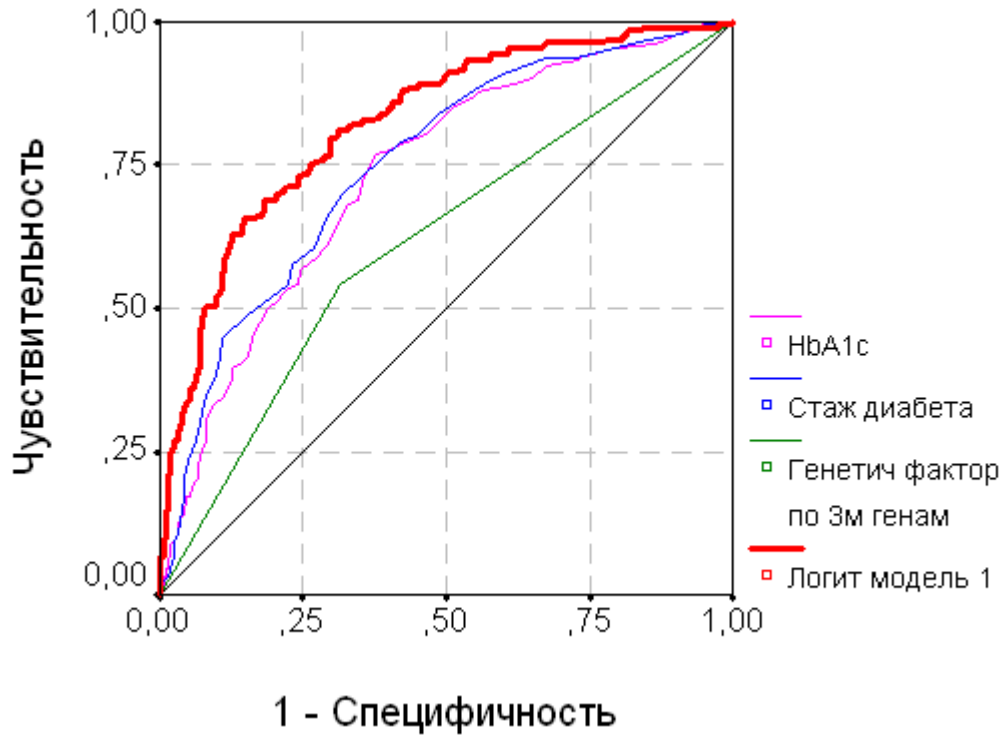


Рисунок 23 – ROC-анализ первой модели логистической регрессии

Таблица 23 – ROC-анализ первой модели логистической регрессии

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error(a)	Asymptotic Sig.(b)	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Логистическая модель 1	0,824	0,020	< 0,001	0,785	0,862
Сочетание генотипов трех генов (VEGF, AKR1B1, APOE)	0,614	0,027	< 0,001	0,562	0,667
Стаж диабета	0,752	0,023	< 0,001	0,708	0,797
Гликированный гемоглобин, %	0,734	0,023	< 0,001	0,688	0,78

Из представленных графиков наглядно видно, что каждый из возможных факторов риска обладает худшими прогностическими способностями, нежели модель с их учетом. У модели 1  $AUC = 0,824$  (95 % ДИ: 0,785–0,862).

Анализ второй модели логистической регрессии с помощью ROC-анализа представлен на рисунке 24 и в таблице 24.

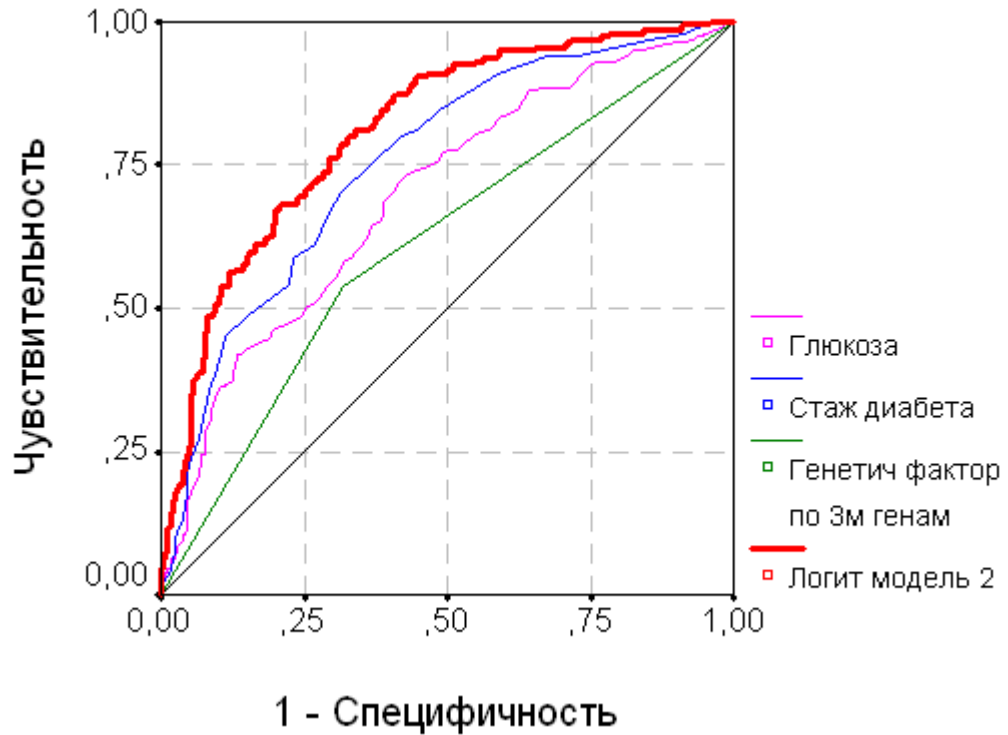


Рисунок 24 – ROC-анализ второй модели логистической регрессии

Таблица 24 – ROC-анализ второй модели логистической регрессии

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error(a)	Asymptotic Sig.(b)	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Логистическая модель 2	0,812	0,020	< 0,001	0,773	0,850
Сочетание генотипов трех генов (VEGF, AKR1B1, APOE)	0,609	0,026	< 0,001	0,557	0,660
Стаж диабета	0,756	0,022	< 0,001	0,712	0,799
Глюкоза	0,696	0,024	< 0,001	0,648	0,743

Из представленных графиков наглядно видно, что каждый из возможных факторов риска также обладает худшими прогностическими способностями, нежели модель с их учетом. У модели 2  $AUC = 0,812$  (95 % ДИ: 0,773–0,850).

Анализ третьей модели логистической регрессии с помощью ROC-анализа представлен на рисунке 25 и в таблице 25.

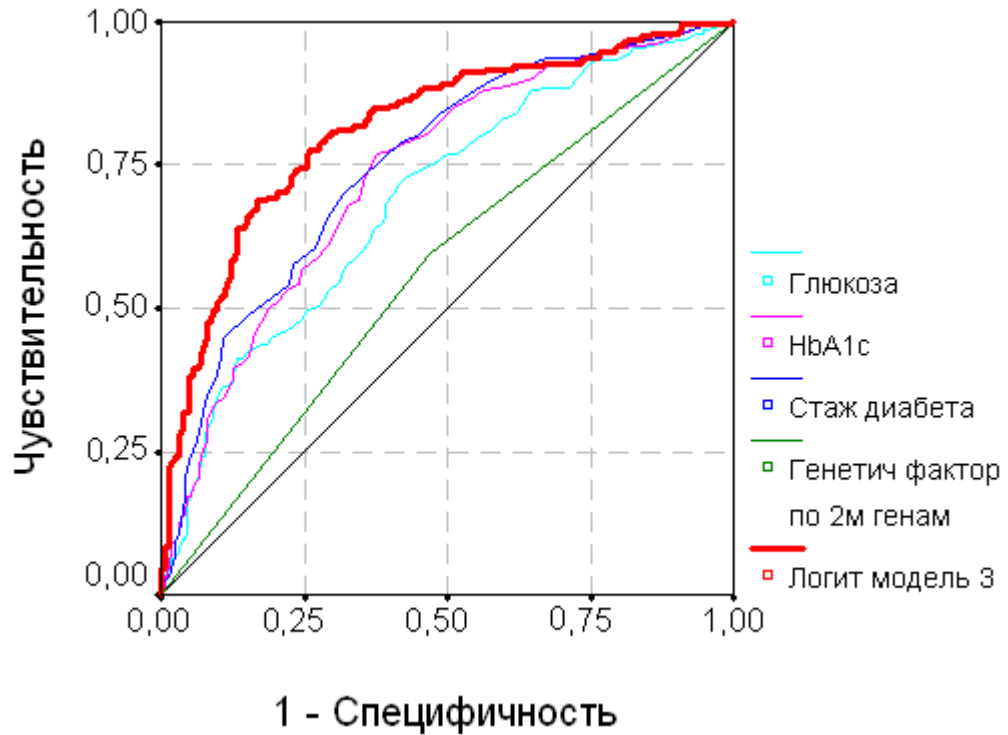


Рисунок 25 – ROC-анализ третьей модели логистической регрессии

Таблица 25 – ROC-анализ третьей модели логистической регрессии

Test Result Variable(s)	Area	Std. Error(a)	Asymptotic Sig.(b)	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Логистическая модель 3	0,814	0,021	< 0,001	0,774	0,855
Сочетание генотипов двух генов (VEGF; AKR1B1)	0,562	0,027	0,024	0,509	0,615
Стаж диабета	0,752	0,023	< 0,001	0,708	0,797
Гликированный гемоглобин, %	0,734	0,023	< 0,001	0,688	0,780
Глюкоза	0,692	0,025	< 0,001	0,643	0,741

При анализе третьей модели установлена аналогичная тенденция: каждый из возможных факторов риска также обладает худшими прогностическими способностями, нежели модель с их учетом. У модели 3 AUC = 0,814 (95 % ДИ: 0,774–0,855).

Исходя из сказанного выше, мы решили взять за основу модель 3, сочетающую два генотипа, а также стаж сахарного диабета, концентрацию глюкозы и гликированного гемоглобина в крови. Провели сравнительный анализ прогностических возможностей этой модели с суммой клинико-лабораторных данных анамнеза пациентов без генетического аспекта (рисунок 26, таблица 26).

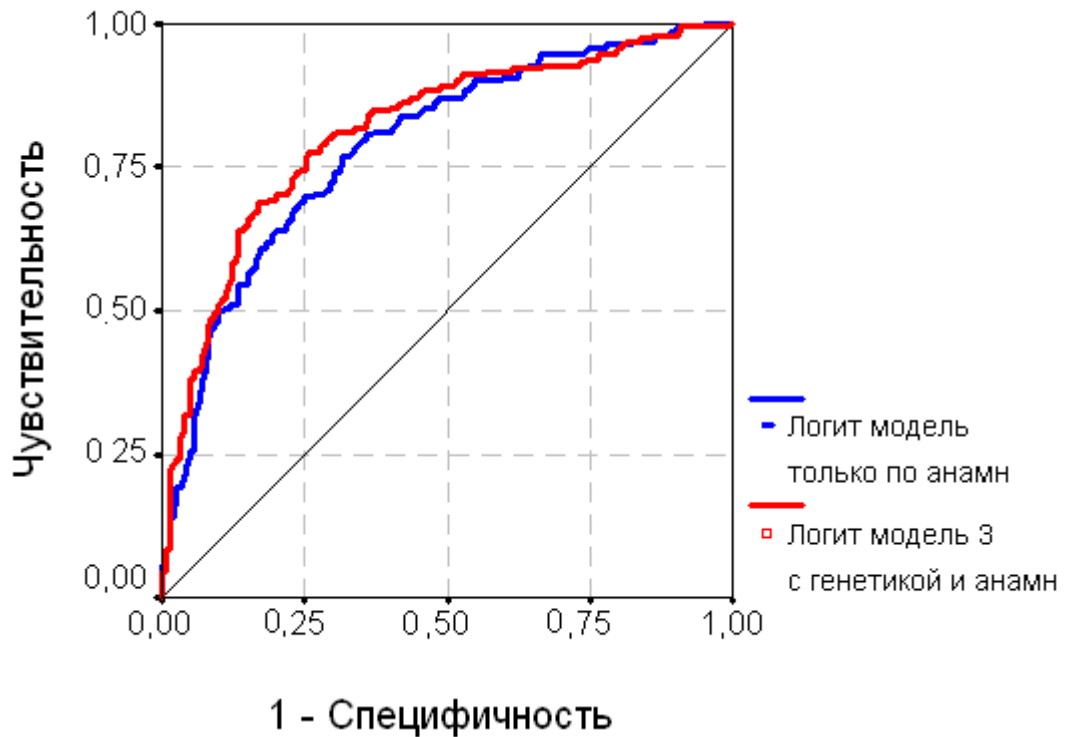


Рисунок 26 – Сравнительны ROC-анализ третьей модели логистической регрессии с совокупностью клинико-лабораторных данных анамнеза пациентов

Таблица 26 – Сравнительны ROC-анализ третьей модели логистической регрессии с совокупностью клинико-лабораторных данных анамнеза пациентов

Test Result Variable(s)	Area AUC – площадь под графиком	Std. Error(a)	p	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Сочетание генотипов двух генов (VEGF; AKR1B1)	0,814	0,021	< 0,001	0,774	0,855
Сочетание концентрации глюкозы в крови и стажа сахарного диабета	0,789	0,021	< 0,001	0,747	0,831

По данным, представленным в таблице, видно, что модель 3 с учетом генетических факторов имеет площадь чуть больше (на 0,025), чем модель только с совокупностью клинико-лабораторных данных анамнеза пациента (0,814 и 0,789 соответственно). Данная разница в показателях статистически значима. Таким образом, установлено, что стаж сахарного диабета, концентрация глюкозы и гликированного гемоглобина в крови – это важные факторы, способствующие возникновению ДР, но с помощью сравнительного ROC-анализа подтверждено, что генетические факторы вносят статистически значимый вклад в развитие данной патологии и обуславливают ее возникновение у больных с компенсированным сахарным диабетом 2-го типа.

### **3.3 Результаты когортного исследования пациентов с диабетической ретинопатией**

Для полноты исследования было решено провести анализ ухудшения стадии диабетической ретинопатии у пациентов в течение года. Результаты представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Анализ ухудшения стадии ДР при наблюдении за пациентами в течение года

Стадия ДР	Изменение стадии ДР				$\chi^2$	p
	не изменилась		ухудшилась			
	Абс.	%	Абс.	%		
Отсутствие ДР	225	85,0	39	15,0	24,3	< 0,001
Непролиферативная ДР	95	97,0	3	3,0		
Препролиферативная ДР	17	77,0	5	23,0		
Пролиферативная ДР	79	100	–	–		

Исходя из полученных данных следует отметить, что среди группы пациентов с отсутствием ДР у 39 человек установлено ухудшение зрения и появление ДР. В целом, всего у 47 человек ухудшилась стадия ДР. Ухудшение

стадии ДР происходило в основном на одну градацию, и лишь у одного пациента сразу из непролиферативной ДР перешла в пролиферативную стадию (таблица 28).

Таблица 28 – Изменение стадий ДР у пациентов через год

Стадии ДР (через год)	Стадии РП (исходная)							
	нет ретинопатии		непролиферативная		препролиферативная		пролиферативная	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Нет ретинопатии	227	86	–	–	–	–	–	–
Непролиферативная	37	14	95	97	–	–	–	–
Преполиферативная	–	–	3	3	17	77	–	–
Пролиферативная	–	–	–	–	5	23	79	100

Дальнейший анализ динамики ДР у пациентов вели по изменению баллов по шкале ETDRS (таблица 29).

Таблица 29 – Анализ баллов у пациентов по ETDRS при наблюдении через год

Стадии ДР	Не изменились баллы по ETDRS		Ухудшились баллы по ETDRS		$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%		
Отсутствие ДР	222	84,0	42	16,0	79,5	< 0,001
Непролиферативная ДР	40	41,0	58	59,0		
Преполиферативная ДР	10	45,0	12	55,0		
Пролиферативная ДР	40	51,0	39	49,0		

Установлено, что изменения баллов по ETDRS у пациентов в зависимости от стадии ДР происходили неравномерно, но статистически значимо. Так, в группе больных с отсутствием ДР увеличились баллы у 16,0 % пациентов, в группе с преполиферативной ДР – у 59,0 % больных, в группе с преполиферативной ДР – у 55,0 %, а в группе с пролиферативной ДР – у 49,0 %, что свидетельствует о прогрессировании ДР.



Также мы оценили взаимосвязь возрастания баллов шкалы ETDRS с генотипами полиморфных генов у пациентов (таблица 30).

Таблица 30 – Анализ взаимосвязи возрастания баллов ETDRS с генотипами полиморфных генов у пациентов

Ген	Вариант генотипа	Изменение баллов ETDRS				$\chi^2$	p
		не изменились		ухудшилась			
		Абс.	%	Абс.	%		
VEGF rs2010963	C/C	98	31	52	34	1,5	0,476
	G/C	130	42	54	36		
	G/G	84	27	45	30		
ADRB3 rs4994	T/T	250	80	121	80	1,0	0,610
	T/C	60	19	30	20		
	C/C	2	1	–	–		
AKR1B1 rs759853	G/G	111	36	61	40	5,6	0,060
	G/A	160	51	61	40		
	A/A	41	13	29	20		
ITGA2 rs2910964	C/C	115	37	45	30	3,4	0,183
	C/T	151	49	76	50		
	T/T	45	14	30	20		
APOE rs7412	C/C	259	83	128	85	2,0	0,370
	C/T	49	16	23	15		
	T/T	4	1	–	–		
APOE rs429358	T/T	231	74	121	80	4,7	0,097
	T/C	79	25	27	18		
	C/C	2	1	3	2		
APOE	e2e2	4	1	–	–	9,2	0,102
	e2e3	44	14	19	13		
	e3e3	183	59	102	68		
	e3e4	74	24	23	15		
	e4e4	2	1	3	2		
	гетерозиготы	5	2	4	3		

По данным, представленным в таблице, видно, что достоверной взаимосвязи возрастания баллов ETDRS у пациентов с различными генотипами полиморфных генов не установлено, но так как данные по гену AKR1B1 находятся на границе статистической значимости, мы провели более детальный анализ (таблица 31).

Таблица 31 – Расчет ОШ для гена AKR1B1

Генотип	Не изменились баллы по ETDRS		Ухудшилась баллы по ETDRS		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%	Референс – 1-й аллель		
Гомозигота 1 GG	111	35,58	61	40,4	1	6,981	0,030
Гетерозигота GA	161	51,60	60	39,7	0,68 (0,44–1,04)		
Гомозигота 2 AA	40	12,82	30	19,9	1,36 (0,77–2,41)		
Итого	312	100	151	100	–	–	–
<i>Аллель 1 – рецессивный</i>							
Гомозигота 1 GG	111	35,6	61	40,4	1	1,013	0,314
Гетерозигота + гомозигота 2 GA+ AA	201	64,4	90	59,6	0,81 (0,55–1,21)		
<i>Аллель 1 – доминантный</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота GG + GA	272	87,2	121	80,1	1	3,938	0,047
Гомозигота 2 AA	40	12,8	30	19,9	1,69 (1–2,83)		
<i>Частоты аллелей</i>							
Аллель 1 G	383	61,4	182	60,3	1	0,106	0,745
Аллель 2 A	241	38,6	120	39,7	1,05 (0,79–1,39)		
<i>Проверяем равновесие</i>							
<i>Контроли</i>		Набл.		Теор			
Гомозигота 1 GG	111	0,356	118	0,377	–	2,439	0,118
Гетерозигота GA	161	0,516	148	0,474	–		
Гомозигота 2 AA	40	0,128	46,5	0,149	–		
<i>Случаи</i>		Теор.		Набл.			
Гомозигота 1 GG	54,84	0,363	61	0,404	–	4,381	0,036
Гетерозигота GA	72,32	0,479	60	0,397	–		
Гомозигота 2 AA	23,84	0,158	30	0,199	–		

Установлено, что в случае предположения доминантности 1-го аллеля (G), гомозиготы по более редкому аллелю А статистически значимо повышают риски ухудшения баллов по ETDRS за год (20 % против 13 %), ОШ = 1,69 (95 % ДИ: 1,00–2,83),  $p = 0,047$ .

На первом этапе нашего исследования с помощью MDR метода было установлено, что сочетание различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 сопряжено с развитием ДР, и определено следующее:

- сочетание гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 с гетерозиготой G/C гена VEGF rs2010963 или гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963 является неблагоприятным и ведет к развитию ДР;
- сочетание гетерозиготы G/A гена AKR1B1 rs759853 и гомозиготы C/C по дикому типу гена VEGF rs2010963 также является неблагоприятным;
- сочетание гомозиготы A/A по редкому аллелю гена AKR1B1 rs759853 и гетерозиготы G/C гена VEGF rs2010963 или гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963 является неблагоприятным и ведет к развитию ДР.

На основании полученных данным мы провели оценку прогноза увеличения баллов ETDRS у пациентов при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 (таблица 32).

Таблица 32 – Прогноз возрастания баллов ETDRS по сочетанию различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853

Прогноз ДР	Риск ДР	Изменение баллов ETDRS				$\chi^2$	p
		Не изменились		Ухудшилась			
		Абс.	%	Абс.	%		
По генам VEGF и AKR1B1	Низкий	166	53,21	53	35,10	12,66	< 0,001
	Повышенный	146	46,79	98	64,90		

По данным, представленным в таблице, видно, что сочетание различных генотипов двух генов дает достоверной прогноз ухудшения баллов ETDRS у пациентов с отсутствием или наличием ДР любой стадии (для неблагоприятного

сочетания генотипов ОШ = 2,1 (95 %, ДИ: 1,41–3,14)). Более детальный анализ сочетания генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 и прогноз возникновения ДР представлен в таблице 33.

Таблица 33 – Детальный прогноз возникновения ДР по сочетанию различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853

		Ген 1 VEGF		
		Гомозиготы по дикому типу C/C	Гетерозиготы G/C	Гомозиготы по редкому аллелю G/G
Ген 3 AKR1B1	Гомозиготы по дикому типу G/G	Хороший прогноз	Неясный прогноз	Неблагоприятный прогноз
	Гетерозиготы G/A	Неясный прогноз	Хороший прогноз	Неясный прогноз
	Гомозиготы по редкому аллелю A/A	Неясный прогноз	Неблагоприятный прогноз	Неблагоприятный прогноз

Используя метод MDR установлено:

- сочетание гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 с гомозиготой C/C гена VEGF rs2010963 и сочетание гетерозиготы G/A гена AKR1B1 rs759853 с гетерозиготой G/C гена VEGF rs2010963 не ведет к развитию ДР (хороший прогноз);

- сочетания гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 с гетерозиготой G/C гена VEGF rs2010963; гетерозиготы G/A гена AKR1B1 rs759853 с гомозиготой по дикому типу C/C гена VEGF rs2010963 или гомозиготой по редкому аллелю G/G гена VEGF rs2010963, а также сочетание гомозиготы по редкому аллелю A/A гена AKR1B1 rs759853 и гомозиготы C/C по дикому типу не являются достоверными факторами в развитии ДР (неясный прогноз, умеренный риск развития ДР).

- сочетания гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 и гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963, гомозиготы A/A по редкому аллелю гена AKR1B1 rs759853 и гетерозиготы G/C гена VEGF rs2010963

или гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963 являются неблагоприятными и ведут к развитию ДР (плохой прогноз).

На основании полученных данных мы провели оценку прогноза увеличения баллов ETDRS у пациентов при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 с учетом риска развития ДР (таблица 34).

Таблица 34 – Прогноз возрастания баллов ETDRS по сочетанию различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 с учетом установленных рисков развития ДР

Прогноз ДР	Риск ДР	Изменение баллов ETDRS				$\chi^2$	p
		не изменились		ухудшилась			
		Абс.	%	Абс.	%		
По генам VEGFi AKR1B1	Низкий	99	31,73	28	18,54	12,541	0,002
	Средний	162	51,92	82	54,30		
	Высокий	51	16,35	41	27,15		

По данным, представленным в таблице, видно статистически значимое возрастание баллов по шкале ETDRS у пациентов с учетом прогнозирования риска возникновения ДР при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853. При прогнозировании высокого риска действительно чаще наблюдалось увеличение баллов (27,15 % против 16,35 %,  $p = 0,002$ , ОШ = 1,91 (1,2–3,04) (рисунок 27).

Ранее нами с помощью MDR метода было установлено, что сочетание различных генотипов трех генов VEGF rs2010963, AKR1B1 rs759853 и APOE (2 локуса) также сопряжено с развитием ДР. Прогноз возрастания баллов ETDRS по сочетанию различных генотипов трех генов VEGF rs2010963, AKR1B1 rs759853 и APOE (2 локуса) выявил тенденцию к их возрастанию, но результат оказался статистически незначимым.

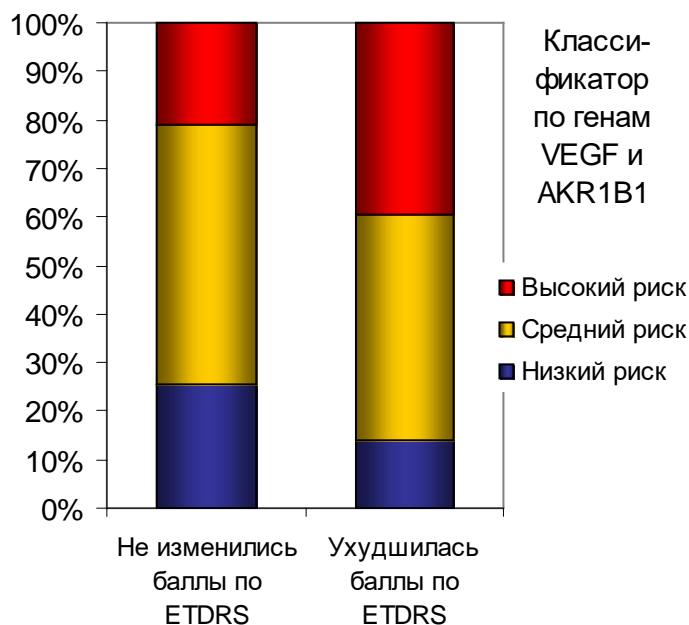


Рисунок 27 – Распределение больных с наличием и отсутствием ухудшений баллов по ETDRS по классификатору на основе полиморфных вариантов гена VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853

### 3.4 Результаты когортного исследования пациентов без диабетической ретинопатии

Особый интерес представляет собой группа больных без ДР, так как за год исследования этим пациентам не проводили никакого специфического лечения ДР, то вклад генетических факторов в развитие заболевания может быть более «чистым».

Также мы оценили взаимосвязь возрастания баллов шкалы ETDRS с генотипами полиморфных геном у пациентов (таблица 35).

Таблица 35 – Анализ взаимосвязи возрастания баллов ETDRS с генотипами полиморфных генов у пациентов без ДР

Ген	Вариант генотипа	Изменение баллов ETDRS				$\chi^2$	p
		не изменились баллы по ETDRS		ухудшилась баллы по ETDRS			
		Абс.	%	Абс.	%		
VEGF rs2010963	C/C	72	32,4	16	38,1	7,27	0,026
	G/C	94	42,3	9	21,4		
	G/G	56	25,2	17	40,5		
ADRB3 rs4994	T/T	178	80,2	34	81,0	0,38	0,826
	T/C	42	18,9	8	19,1		
	C/C	2	0,9	–	–		
AKR1B1 rs759853	G/G	85	38,3	14	33,3	10,33	0,006
	G/A	114	51,4	16	38,1		
	A/A	23	10,4	12	28,6		
ITGA2 rs2910964	C/C	76	34,4	14	33,3	0,46	0,794
	C/T	112	50,7	20	47,6		
	T/T	33	14,9	8	19,1		
APOE rs7412	C/C	184	82,9	38	90,5	1,67	0,435
	C/T	36	16,2	4	9,5		
	T/T	2	0,9	–	–		
APOE rs429358	T/T	165	74,3	31	73,8	5,99	0,050
	T/C	56	25,2	9	21,4		
	C/C	1	0,5	2	4,8		
APOE	e2e2	2	0,9	–	–	8,27	0,142
	e2e3	32	14,4	3	7,1		
	e3e3	131	59,0	28	66,7		
	e3e4	52	23,4	8	19,1		
	e4e4	1	0,5	2	4,8		
	гетерозиготы	4	1,8	1	2,4		

Установлена достоверная взаимосвязь возрастания баллов ETDRS у пациентов с различными генотипами полиморфных геном VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853, и для них мы провели более детальный анализ (таблица 36, 37).

Таблица 36 – Расчет ОШ для гена VEGF rs2010963

Генотип	Не изменились баллы по ETDRS		Ухудшилась баллы по ETDRS		ОШ (95 % ДИ)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 CC	72	32,43	16	38,1	1	7,27	0,026
Гетерозигота GC	94	42,34	9	21,4	0,43 (0,18–1,03)		
Гомозигота 2 GG	56	25,23	17	40,5	1,37 (0,63–2,94)		
Итого	222	100	42	100	–		
<i>Аллель 1 – рецессивный</i>							
Гомозигота 1 CC	72	32,4	16	38,1	1	0,51	0,475
Гетерозигота + гомозигота 2 GC +GG	150	67,6	26	61,9	0,78 (0,39–1,54)		
<i>Аллель 1 – доминантный</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота CC+ GC	166	74,8	25	59,5	1	4,106	0,043
Гомозигота 2 GG	56	25,2	17	40,5	2,02 (1,01–4,01)		
<i>Частоты аллелей</i>							
Аллель 1 C	238	53,6	41	48,8	1	0,651	0,420
Аллель 2 G	206	46,4	43	51,2	1,21 (0,76–1,93)		
<i>Проверяем равновесие</i>							
<i>Контроли</i>		Набл.		Теор			
Гомозигота 1 CC	72	0,324	63,8	0,287	–	4,911	0,027
Гетерозигота GC	94	0,423	110	0,497	–		
Гомозигота 2 GG	56	0,252	47,8	0,215	–		
<i>Случаи</i>		Теор.		Набл.			
Гомозигота 1 CC	10,01	0,238	16	0,381	–	13,7	< 0,001
Гетерозигота GC	20,99	0,500	9	0,214	–		
Гомозигота 2 GG	11,01	0,262	17	0,405	–		



Таблица 37 – Расчет ОШ для гена AKR1B1 rs759853

Генотип	Не изменились		Ухудшилась		ОШ (95 %ДИ)	$\chi^2$	p
	баллы по ETDRS		баллы по ETDRS				
	Абс.	%	Абс.	%	Референс – 1-й аллель		
Гомозигота 1 GG	85	38,29	14	33,3	1	10,33	0,006
Гетерозигота GA	114	51,35	16	38,1	0,85 (0,39–1,84)		
Гомозигота 2 AA	23	10,36	12	28,6	3,17 (1,29–7,78)		
Итого	222	100	42	100	–		
<i>Аллель 1 – рецессивный</i>							
Гомозигота 1 GG	85	38,3	14	33,3	1	0,37	0,543
Гетерозигота + гомозигота 2 GA + AA	137	61,7	28	66,7	1,24 (0,62–2,49)		
<i>Аллель 1 – доминантный</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота GG + GA	199	89,6	30	71,4	1	10,19	0,001
Гомозигота 2 AA	23	10,4	12	28,6	3,46 (1,56–7,68)		
<i>Частоты аллелей</i>							
Аллель 1 G	284	64,0	44	52,4	1	4,027	0,045
Аллель 2 A	160	36,0	40	47,6	1,61 (1,01–2,58)		
<i>Проверяем равновесие</i>							
<i>Контроли</i>		Набл.		Теор			
Гомозигота 1 GG	85	0,383	90,8	0,409	–	2,88	0,090
Гетерозигота GA	114	0,514	102	0,461	–		
Гомозигота 2 AA	23	0,104	28,8	0,130	–		
<i>Случаи</i>		Теор.		Набл.			
Гомозигота 1 GG	11,52	0,274	14	0,333	–	2,346	0,126
Гетерозигота GA	20,95	0,499	16	0,381	–		
Гомозигота 2 AA	9,524	0,227	12	0,286	–		

Установлено, что у пациентов, гомозиготных по более редкому аллелю, с большей вероятностью происходит ухудшение по шкале ETDRS в течение года с ОШ = 2,02 (1,01–4,01), p = 0,043 (рисунок 28).

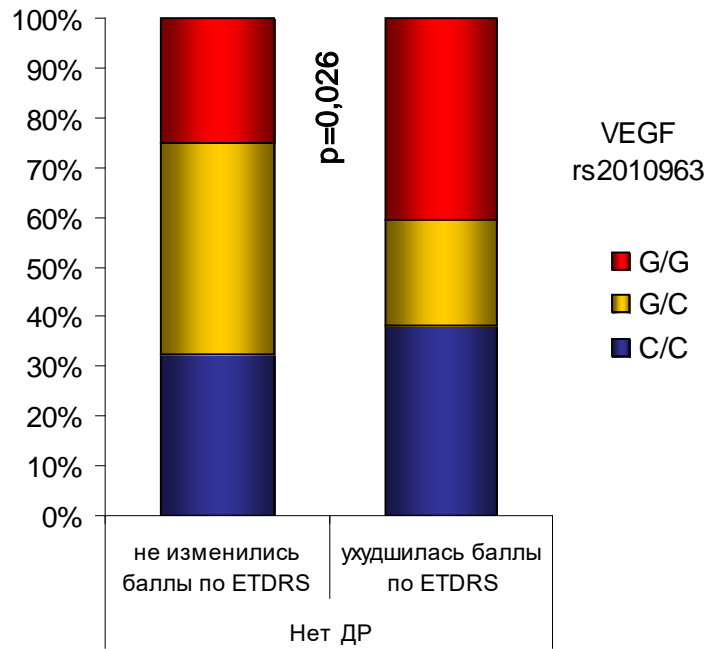


Рисунок 28 – Распределение пациентов с наличием и отсутствием ухудшений баллов по ETDRS по классификатору на основе полиморфных вариантов гена VEGF rs2010963

Установлено, что у пациентов, гомозиготных по более редкому аллелю с большей вероятностью происходит ухудшение по шкале ETDRS в течение года с ОШ = 3,46 (1,56–7,68),  $p = 0,001$  (рисунок 29).

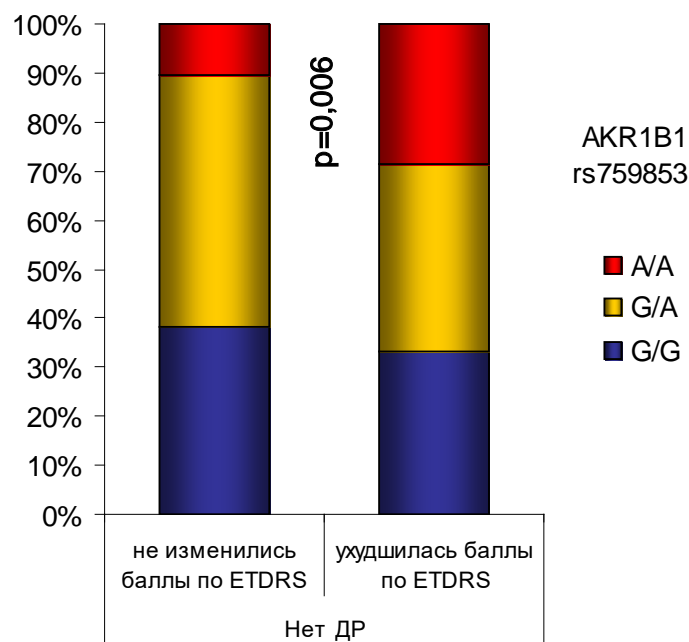


Рисунок 29 – Распределение пациентов с наличием и отсутствием ухудшений баллов по ETDRS по классификатору на основе полиморфных вариантов AKR1B1 rs759853

Для гена APOE rs429358 установлена взаимосвязь возрастания баллов ETDRS у пациентов с различными генотипами на границе достоверности, и мы также провели детальный анализ, который позволил выявить некоторые различия за счет единичных случаев редкого генотипа CC, которые при перепроверке точным методом Фишера потеряли статистическую значимость.

На основании полученных данным мы провели оценку прогноза увеличения баллов ETDRS у пациентов без ДР при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 (таблица 38).

Таблица 38 – Прогноз возрастания баллов ETDRS по сочетанию различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 у пациентов без ДР

Прогноз ДР	Риск ДР	Изменение баллов ETDRS				$\chi^2$	p
		не изменились		ухудшились			
		Абс.	%	Абс.	%		
По генам VEGF и AKR1B1	Низкий	122	55,0	18	42,9	1,62	0,203
	Повышенный	100	45,1	24	57,1		
По генам VEGF и AKR1B1	Низкий	77	34,7	7	16,7	9,29	0,010
	Средний	113	50,9	22	52,4		
	Высокий	32	14,4	13	31,0		
По генам VEGF и AKR1B1 и APOE	Низкий	156	70,3	23	54,8	3,21	0,073
	Повышенный	66	29,7	19	45,2		

Достоверным оказался только классификатор по двум генам VEGF и AKR1B1 с тремя уровнями риска.

Таким образом, нами проведено когортное исследование пациентов с ДР для установления прогрессирования стадий ДР и изменения баллов по шкале ETDRS.

По гену AKR1B1 установлено, что в случае предположения доминантности 1-го аллеля (G) гомозиготы по более редкому аллелю А статистически значимо повышают риски ухудшения баллов по ETDRS за год (20 % против 13 %), ОШ = 1,69 (95 % ДИ: 1,00–2,83), p = 0,047.

При анализе прогноза увеличения баллов ETDRS у пациентов при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 было установлено следующее:

- сочетание гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 с гомозиготой C/C гена VEGF rs2010963 и сочетание гетерозиготы G/A гена AKR1B1 rs759853 с гетерозиготой G/C гена VEGF rs2010963 не ведет к развитию ДР (хороший прогноз);

- сочетания гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 с гетерозиготой G/C гена VEGF rs2010963; гетерозиготы G/A гена AKR1B1 rs759853 с гомозиготой по дикому типу C/C гена VEGF rs2010963 или гомозиготой по редкому аллелю G/G гена VEGF rs2010963, а также сочетание гомозиготы по редкому аллелю A/A гена AKR1B1 rs759853 и гомозиготы C/C по дикому типу не являются достоверными факторами в развитии ДР (неясный прогноз);

- сочетания гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 и гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963, гомозиготы A/A по редкому аллелю гена AKR1B1 rs759853 и гетерозиготы G/C гена VEGF rs2010963 или гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963 являются неблагоприятными и ведут к развитию ДР (плохой прогноз).

Анализ изменений за год у пациентов без ДР определяет вклад генетического фактора в развитие заболевания.

По генам VEGF и AKR1B1 установлено, что гомозиготы по более редкому аллелю с большей вероятностью получают ухудшения ETDRS в течение года с ОШ = 2,02 (1,01–4,01),  $p = 0,043$  и ОШ = 3,46 (1,56–7,68),  $p = 0,001$  соответственно.

На основе совокупности установленных данных и модели 3, модели логистической регрессии нами была разработана программа-калькулятор (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» № 2022614737) для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии, которая учитывает сочетание

генотипов двух генов у пациентов (VEGF и AKR1B1), концентрацию глюкозы, гликированного гемоглобина и стаж диабета. На основе полученных данных программа высчитывает вероятность развития ДР (вероятность более 40 % считается высокой) и позволяет врачу определять наиболее эффективную тактику ведения и терапии пациента с ДР.

Существуют клинические рекомендации, согласно которым пациенты, страдающие СД, должны находиться под систематическим наблюдением офтальмолога из-за высокой вероятности возникновения диабетической ретинопатии, и это наблюдение строится по следующим принципам:

- пациент должен быть осмотрен офтальмологом сразу же (или как можно раньше) после выявления СД;
- если при первичном осмотре у пациента не выявлено диабетических изменений глаз, дальнейшие осмотры проводятся не реже одного раза в год. Но если у пациента установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности развития ДР ниже 40 % с использованием программы-калькулятора, назначается стандартное офтальмологическое обследование ежегодно, а при вероятности более 40 % – каждые полгода;
- пациенты с сохраняющимся высоким уровнем гликемии (уровень гликированного гемоглобина  $> 9\%$ ) и артериальной гипертензией (артериальное давление выше 160/95 мм рт. ст.) должны осматриваться офтальмологом не реже одного раза в 6–8 месяцев даже при отсутствии патологических изменений на глазном дне при первичном осмотре. Но если у пациента установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности развития ДР ниже 40 % с использованием программы-калькулятора, назначается стандартное офтальмологическое обследование не реже одного раза в 6–8 месяцев, а при вероятности более 40 % – каждые 3 месяца;
- офтальмологическое обследование женщин, страдающих СД и пожелавших иметь ребенка, необходимо проводить до зачатия (в период

планирования беременности) и каждые 3 месяца после подтверждения беременности. Но если у женщины установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности развития ДР ниже 40 % с использованием программы-калькулятора, рекомендовано стандартное офтальмологическое обследование каждые 3 месяца, а при вероятности более 40 % – каждый месяц.

В настоящее время стандартный протокол офтальмологического ведения больных сахарным диабетом выглядит следующим образом (таблица 39).

Таблица 39 – Протокол офтальмологического ведения больных с сахарным диабетом

МОДЕЛИ БОЛЬНЫХ	ЛЕЧЕБНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ
Отсутствие диабетической ретинопатии	Стандартное офтальмологическое обследование. Повторный осмотр через 12 месяцев
Непролиферативная ретинопатия без макулярного отека	Стандартное офтальмологическое обследование. Повторный осмотр через 6 месяцев
Непролиферативная ретинопатия с макулярным отеком менее 400 микрон	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (макулярный тест), оптическая когерентная томография (ОКТ), флюоресцентная ангиография глазного дна (ФАГ) при необходимости. Фокальная (и/или по типу «решетки») лазеркоагуляция сетчатки в течение 4–6 недель с момента диагностики. Повторный осмотр через 2–3 месяца. При сохранении отека – дополнительная лазерная коагуляция
Непролиферативная ретинопатия с макулярным отеком более 400 микрон	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (макулярный тест), ОКТ, ФАГ при необходимости. Интравитреальное введение кристаллических кортикостероидов («Кеналог»)¹ или ингибиторов ангиогенеза («Авастин»)². При введении кортикостероидов – контроль внутриглазного давления (ВГД). Фокальная (и/или по типу «решетки») лазеркоагуляция сетчатки через 2 недели после ИВВА и через 4 недели после ИВВК. Повторный осмотр через 2–3 месяца. При сохранении отека по

МОДЕЛИ БОЛЬНЫХ	ЛЕЧЕБНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ
	данным ОКТ (или при его рецидиве) возможна дополнительная лазеркоагуляция в сочетании с ИВВА. Осмотр через 6 месяцев. При отсутствии эффекта от лечения – витрэктомия
Непролиферативная ретинопатия с макулярным отеком вследствие нарушения витреоретинального контакта (тракционный макулярный отек)	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (макулярный тест), ОКТ, ФАГ при необходимости. Витрэктомия. Осмотр через 2 месяца
Препролиферативная или пролиферативная ретинопатия без макулярного отека	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (скрининговый тест). Панретинальная лазеркоагуляция сетчатки (ПРЛКС). Первый сеанс в течение 3–6 недель с момента диагностики. Повторный осмотр через 3 месяца. При отсутствии стабилизации – дополнительная лазерная коагуляция
Препролиферативная или пролиферативная ретинопатия с макулярным отеком менее 400 микро	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (скрининговый и макулярный тесты), ОКТ, ФАГ при необходимости. Фокальная (и/или по типу «решетки») лазеркоагуляция сетчатки в течение 3-х недель с момента диагностики. ПРЛКС. Первый сеанс через 3–6 недель после выполнения фокальной (и/или по типу «решетки») лазеркоагуляции сетчатки. Повторный осмотр через 2 месяца. При отсутствии стабилизации – дополнительная лазерная коагуляция
Препролиферативная или пролиферативная ретинопатия с макулярным отеком более 400 микрон	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (скрининговый и макулярный тесты), ОКТ, ФАГ при необходимости. ИВВК или ИВВА. При введении кортикостероидов – контроль ВГД. Фокальная (и/или по типу «решетки») лазеркоагуляция сетчатки через через 2 недели после ИВВА и через 4 недели после ИВВК. ПРЛКС. Первый сеанс через 2 недели после выполнения фокальной (и/или по типу «решетки») лазеркоагуляции сетчатки. При наличии ретинопатии высокого риска потери зрения первый сеанс ПРЛКС можно сочетать с проведением лазеркоагуляции в макулярной области. Повторный осмотр через 3 месяца. При отсутствии стабилизации течения ретинопатии – дополнительная

МОДЕЛИ БОЛЬНЫХ	ЛЕЧЕБНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ
	лазерная коагуляция. При стабилизации течения ретинопатии – контроль состояния макулярной зоны (ОКТ). Осмотр через 6 месяцев. При отсутствии эффекта от лечения – витрэктомия
Пролиферативная ретинопатия с кровоизлиянием в стекловидное тело, не препятствующим выполнению лазеркоагуляции сетчатки	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (скрининговый тест). ПРЛКС (в первый сеанс обрабатываются нижние отделы сетчатки). Повторный осмотр через 3 месяца. При отсутствии стабилизации – дополнительная коагуляция
Пролиферативная ретинопатия с кровоизлиянием в стекловидное тело, препятствующим выполнению лазеркоагуляции сетчатки у пациента, не получавшего раньше лазерного лечения	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (если возможна), В-сканирование. Повторные осмотры каждые 1–2 недели (возможно ношение «дырчатых» очков). При рассасывании кровоизлияния (хотя бы частичном) – ПРЛКС. При отсутствии возможности выполнить коагуляцию в течение 3 месяцев – витрэктомия. После выполнения витрэктомии – осмотр через 1 месяц. При наличии активной неоваскуляризации – ПРЛКС (возможно в сочетании с ИВВА)
Пролиферативная ретинопатия с кровоизлиянием в стекловидное тело, препятствующим выполнению лазеркоагуляции сетчатки у пациента, после ранее проведенного лазерного лечения (ПРЛКС)	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (если возможна), В-сканирование. Повторный осмотр через 4–6 недель (возможно ношение «дырчатых» очков). При рассасывании кровоизлияния – дополнительная коагуляция. При отсутствии возможности выполнить коагуляцию – осмотр через 2–3 месяца. При отсутствии положительной динамики – витрэктомия. После выполнения витрэктомии – осмотр через 1 месяц. При необходимости – дополнительная коагуляция



МОДЕЛИ БОЛЬНЫХ	ЛЕЧЕБНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ АЛГОРИТМ
Пролиферативная ретинопатия с витреоретинальной тракцией без активной неоваскуляризации	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (скрининговый тест), В-сканирование. ПРЛКС. Первый сеанс в течение 4-х недель с момента диагностики. Повторный осмотр через 3 месяца. При отсутствии стабилизации – витрэктомия. После выполнения витрэктомии – осмотр через 1 месяц
Пролиферативная ретинопатия с витреоретинальной тракцией при наличии активной неоваскуляризации	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (скрининговый тест), В-сканирование. ПРЛКС. Первый сеанс в течение 2-х недель с момента диагностики. Повторный осмотр через 2 месяца. При отсутствии стабилизации – дополнительная коагуляция или витрэктомия. После выполнения витрэктомии – осмотр через 1 месяц
Пролиферативная ретинопатия с тракционной отслойкой сетчатки, захватывающей макулярную зону или угрожающей ей	Стандартное офтальмологическое обследование. Дополнительно – периметрия (скрининговый тест), В-сканирование. Витрэктомия. После выполнения витрэктомии – осмотр через 1 месяц

Примечание: <sup>1</sup> – интравитреальное введение «Кеналога» – ИВВК;

<sup>2</sup> – интравитреальное введение «Авастина» – ИВВА.

«Кеналог» и «Авастин» не имеют официального разрешения для интравитреального введения, и во всем мире вводятся off-label (сверх определенных рекомендаций). Использование этих препаратов для введения в стекловидное тело возможно только при наличии разрешения Этического комитета в рамках проведения научно-исследовательских работ.

С использованием разработанной программы для ЭВМ «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» рекомендуются следующие изменения протокола ведения пациентов с сахарным диабетом:

- Независимо от стадии диабетической ретинопатии и сопутствующих осложнений всем пациентам рекомендована максимально стабильная

компенсация СД, нормализация артериального давления и липидного профиля под контролем врача-эндокринолога-офтальмолога.

- Для пациентов с отсутствием диабетической ретинопатии, но наличием сочетания генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности развития ДР ниже 40 % назначается стандартное офтальмологическое обследование ежегодно, а при вероятности более 40 % стандартное офтальмологическое обследование рекомендуется проходить 1 раз в 6 месяцев.

- Для пациентов с непролиферативной ретинопатией без макулярного отека, но наличием сочетания генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности прогрессирования ДР ниже 40 % назначается стандартное офтальмологическое обследование каждые 6 месяцев, а при вероятности более 40 % стандартное офтальмологическое обследование рекомендуется проходить 1 раз в 3 месяца.

- Для пациентов с непролиферативной ретинопатией с макулярным отеком более 400 микрон и наличием сочетания генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности прогрессирования ДР ниже 40 % назначается стандартное лечение согласно протоколу, а при вероятности прогрессирования более 40 % рекомендуется назначение анти-VEGF-препаратов (ранибизумаб, бевацизумаб) в виде интравитреальных инъекций.

- Для пациентов с непролиферативной ретинопатией с макулярным отеком более 400 микрон и наличием сочетания генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности прогрессирования ДР ниже 40 % назначается стандартное лечение согласно протоколу, а при вероятности прогрессирования более 40 % также стандартное лечение согласно протоколу, но осмотр после окончания терапии через 3 месяца, а не через полгода.

- Для пациентов с непролиферативной ретинопатией с макулярным отеком вследствие нарушения витреоретинального контакта (тракционный макулярный отек) рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если выше – рекомендуется осмотр после витрэктомии не через 2 месяца, а через месяц из-за возрастающей возможности осложнений.

- Для пациентов с препролиферативной или пролиферативной ретинопатией без макулярного отека рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если выше – рекомендуется осмотр после панретиальной лазеркоагуляции сетчатки не через 3 месяца, а через 2 месяца из-за возрастающей возможности осложнений.

- Для пациентов с препролиферативной или пролиферативной ретинопатией с макулярным отеком менее 400 микрон рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если выше – рекомендуется повторный осмотр после панретиальной лазеркоагуляции сетчатки не через 2 месяца, а через месяц из-за возрастающей возможности осложнений.

- Для пациентов с препролиферативной или пролиферативной ретинопатией макулярным отеком более 400 микрон рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если выше – рекомендуется повторный осмотр после панретиальной лазеркоагуляции сетчатки не через 3 месяца, а через 1,5 месяца, и если достигнута стабилизация

течения диабетической ретинопатии предлагается контроль состояния осуществлять не каждые 6 месяцев, а каждые 3 месяца.

- Для пациентов с пролиферативной ретинопатией с кровоизлиянием в стекловидное тело, не препятствующим выполнению лазеркоагуляции сетчатки, с макулярным отеком менее 400 микрон рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если выше – рекомендуется повторный осмотр после панретинальной лазеркоагуляции сетчатки не через 3 месяца, а через месяц из-за возрастающей возможности осложнений.

- Для пациентов с пролиферативной ретинопатией с кровоизлиянием в стекловидное тело, препятствующим выполнению лазеркоагуляции сетчатки у пациента, не получавшего раньше лазерного лечения рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если выше – рекомендуется обязательное назначение анти-VEGF-препаратов (ранибизумаб, бевацизумаб) в виде интравитреальных инъекций.

- Для пациентов с пролиферативной ретинопатией с витреоретинальной тракцией без активной неоваскуляризации рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если вероятность прогрессирования выше 40 %, то рекомендуется повторный осмотр после панретинальной лазеркоагуляции сетчатки проводить не через 3 месяца после процедуры, а через месяц.

- Для пациентов с пролиферативной ретинопатией с витреоретинальной тракцией при наличии активной неоваскуляризации рекомендуется соблюдать неизменно указанный выше протокол если установлено сочетание генотипов двух

генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета вероятность прогрессирования ДР ниже 40 %, а если выше – повторный осмотр после панретинальной лазеркоагуляции сетчатки проводить не через 2 месяца после процедуры, а через месяц.

Таким образом, использование программы-калькулятора для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии врачом-офтальмологом позволяет изменять тактику ведения и, отчасти, терапии пациентов с различными типами ДР и пациентов с отсутствием ДР, но имеющих высокий риск ее возникновения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стремительное возрастание количества пациентов с сахарным диабетом вызывает тревогу. Большой частью рост заболеваемости обязан именно СД 2-го типа, который составляет 80–90 % всех случаев данной патологии [81].

Диабетическая ретинопатия – одно из проявлений диабетической микроангиопатии, возникающее при поражении сосудов сетчатки. Это состояние часто наблюдается при длительном течении СД и является одной из ведущих причин слепоты, однако адекватное и своевременное офтальмологическое обследование позволяет выявить развитие ретинопатии на ранних стадиях, до появления патологических изменений, ведущих к инвалидизации [56, 111, 114, 123, 135].

Несмотря на большое разнообразие и высокое качество лекарственных препаратов для купирования СД и достижение целей лечения, а также разработку единых международных подходов к терапии данного заболевания, отмечено, что компенсация сахарного диабета и стабильная поддержка целевых значений гликированного гемоглобина не предотвращает развитие поздних осложнений у всех пациентов. Данная ситуация позволяет предположить вклад генетических факторов в развитие диабетической ретинопатии, как одно из осложнений СД [57, 125, 129, 136].

Сам по себе СД 2-го типа не является генетическим заболеванием, его возникновение, и развитие связывают с большим количеством генов, и их взаимодействием между собой и факторами окружающей среды. Предполагается, что СД 2-го типа развивается у людей, которые имеют мутации в генах, кодирующих процессы синтеза, секреции и действия инсулина [29, 180].

Установлено, что при сахарном диабете за счет высокой концентрации глюкозы в сетчатке повышается интенсивность метаболических процессов и возникает гипоксия за счет торможения анаэробной фазы окисления, усиливается гликолиз и снижается эффективность энергетического обмена. Все эти процессы приводят к накоплению побочных продуктов обмена (пирувата и лактата) в

сетчатке, а также в задних слоях стекловидного тела, обуславливая возникновение местного ацидоза, который оказывает неблагоприятное влияние как на ретинальную гемоциркуляцию, так и на метаболизм сетчатки [34, 66, 130]. По сути, основными патохимическими метаболитами в развитии ДР являются соединения глюкозы с белками и конечные продукты неферментативного гликолизирования белков, липидов и нуклеиновых кислот.

В целом патогенез диабетической ретинопатии крайне сложен, и его центральным звеном является, как было сказано выше, нарушение микроциркуляции, связанное, по мнению многих исследователей, с наследственными особенностями строения сосудов сетчатки и метаболическими сдвигами, сопровождающими сахарный диабет. В вовлеченных в патологический процесс капиллярах возникает выпячивание и расширение стенок, и появляются микроаневризмы [70, 76, 79, 131]. Как правило, они располагаются в венозных капиллярах сетчатки на границе неперфузируемых зон, что можно интерпретировать как ответ на локальную ишемию [3, 8, 16, 17, 108, 137, 138, 187].

Гипергликемия является пусковым элементом в патогенезе ДР, стимулируя появление метаболических изменений в нейронах, формирование гиперосмолярного отека, деформацию клеток и нарушение их функциональной активности. Это, отчасти, связано с активацией альдозоредуктазы и накоплением таких гидрофильных соединений, как сорбит и фруктоза, что происходит в организме и в норме, но значительно с большей интенсивностью при хронической гипергликемии [41, 44, 62, 113, 140, 159, 178].

Хроническая гипергликемия является причиной гликозилирования белков, и их метаболизм приводит к формированию конечных продуктов гликозилирования, которые оказывают повреждающее действие: снижают активность ферментных систем, связываясь с рецепторами эндотелиоцитов, ускоряют синтез ряда факторов (например, эндотелин-1), обладающих выраженным вазоконстриктерным эффектом, что сопровождается снижением синтеза простаглицина в эндотелиоцитах и усилением синтеза тромбосана в тромбоцитах. Все это способствует тромбообразованию и, в конечном итоге,

может приводить к синдрому диффузного внутрисосудистого свертывания [66, 76, 120, 127, 141, 177, 188]. Данные процессы сдвигают хрупкое окислительно-восстановительное равновесие в организме в сторону увеличения процессов окисления, провоцируя оксидативный стресс и накопление липопротеидов в пенистых клетках, что ведет к атеросклеротическому поражению сосудов [66, 76, 88, 142, 189]. Модифицированные липопротеиды, в свою очередь, принимают участие в повреждении эндотелиальных клеток, способствуя развитию микроангиопатии [145, 179].

Механизм патогенеза такого заболевания, как сахарный диабет 2-го типа, крайне сложен, но в литературе имеются данные о генетических аспектах этой патологии [3, 12, 19]. Так, мутация в 64 кодоне гена ADRB3 с заменой триптофана на аргинин (Trp64Arg, rs4994) в белковом продукте гена ADRB3 связана с увеличением индекса массы тела, висцеральным ожирением, резистентностью к инсулину и развитием СД 2-го типа [69, 106, 175]. Аполипопротеин Е играет центральную роль в метаболизме липидов. Его основная функция – транспорт холестерина к тканям от мест его синтеза или всасывания в составе ЛНП и ЛОНП. Обнаружена ассоциация генотипов APOE не только с метаболизмом липидов, но и окислительным стрессом, воспалительными процессами, вовлеченность в различные аспекты старения и процессы канцерогенеза [22, 71].

В основе поражения органа зрения при СД 2-го типа лежит хроническая гипергликемия, шунтирование метаболизма глюкозы по полиоловому пути, нарушение функции внутреннего, а затем и наружного слоя гематоретинального барьера (ГРБ), и все это обусловлено полиморфизмами различных генов. Ген AKR1B1 кодирует фермент альдозоредуктазу, участвующую в метаболизме глюкозы и осморегуляции. Альдозоредуктаза находится в различных тканях и пигментных клетках сетчатки и превращает глюкозу в сорбит, концентрация которого сильно возрастает при гипергликемии, он плохо диффундирует через билипидную мембрану, тем самым вызывая ее осмотическое повреждение. Нарушение функции ГРБ предшествует клиническим проявлениям ДР, а степень увеличения его проницаемости коррелирует с тяжестью ДР. Неферментативное



гликозилирование белков сосудистой стенки, прямое глюкозотоксичное воздействие на клеточные структуры, а также аутоокисление глюкозы, белков и липидов приводит к развитию оксидативного стресса. Дислипидемия, а также иммунокомплексное повреждение базальной мембраны, перицитов и эндотелия усугубляют изменения сосудистой стенки. Ретинальное кровообращение лишено внешней иннервации и поэтому полностью зависит от эндотелиальной саморегуляции, и, следовательно, эндотелиальная дисфункция у больных сахарным диабетом может оказывать существенное влияние на локальную гемодинамику в сетчатке [1, 3, 5, 8, 16, 19, 27, 32].

Ген эндотелиальной синтеза оксида азота (NOS3) ассоциирован с различными сосудистыми осложнениями при СД 1-го и 2-го типа и отвечает за снижение эндотелий-зависимой вазодилатации наряду с увеличением вазоконстрикции, что ведет к дисфункции эндотелия и влияет на локальную гемодинамику в сетчатке. При длительности СД более 10 лет происходит компенсаторная активация синтеза NO в водянистой влаге. В условиях оксидативного стресса NO взаимодействует со свободными радикалами кислорода с образованием токсичного для перицитов пероксинитрита. Истощение источников синтеза NO приводит к изменениям регионарного гемостаза и нарушению регуляции тонуса ретинальных сосудов [6, 13, 14, 149].

Значительный вклад в патогенез ДР вносит тканевая ренин-ангиотензиновая и кинин-калликреиновая системы. Ангиотензин-превращающий фермент, с одной стороны, регулирует образование мощного вазоконстриктора ангиотензина II, а с другой стороны, осуществляет деградацию брадикинина, нарушает синтез простаглицлина и NO в эндотелии сосудов, стимулирует агрегацию тромбоцитов и систему образования эндотелина-1. Нарастающая гипоксия является стимулом к выделению провоспалительных цитокинов, ангиогенных и антиангиогенных факторов роста, которые запускают процесс неоваскуляризации сетчатки [16, 27, 46, 89]. Развитие и прогрессирование ДР и диабетического макулярного отека определяется равновесием между проангиогенными и антиангиогенными факторами.

В условиях гипоксии в сетчатке под действием VEGF при участии протеаз (матриксных металлопротеиназ, урокиназы и др.) проходят начальные этапы ангиогенеза: деградация базальной мембраны эндотелия капилляров, выход и миграция эндотелиальных клеток в экстрацеллюлярном матриксе. VEGF опосредует рост новообразованных сосудов до момента привлечения перицитов, стабилизирующих сосудистую сеть [92, 107, 167, 170]. Также VEGF вызывает повышение проницаемости сосудистой стенки, нарушение работы ГРБ за счет фосфорилирования плотных контактов эндотелиальных клеток. Повышение проницаемости ГРБ ведет к формированию ДМО. Также в этот процесс включается ген ITGA2, кодирующий интегрин альфа-2, экспрессирующийся на мембранах различных клеток, включая мегакариоциты, фибробласты и тромбоциты. Благодаря интегринам тромбоциты образуют монослой в области поврежденных тканей, что является необходимым условием включения последующих звеньев свертывающей системы крови.

VEGF вызывает увеличение экспрессии молекул адгезии лейкоцитов VCAM1, ECAM1, PECAM-1, P-selectin, которые повышают адгезию лейкоцитов в микрососудах сетчатки, что приводит к потере эндотелиальных клеток и нарушению проницаемости ГРБ, диапедезу и инфильтрации сетчатки лейкоцитами. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) привлекает перициты и гладкомышечные клетки вокруг формирующихся сосудистых трубочек и вызывает микрососудистое ветвление, является аутокринным стимулятором пролиферации клеток пигментного эпителия сетчатки. В плазме крови и стекловидном теле больных с ДР отмечается повышенный уровень PDGF [109, 110, 170].

Ангиопоэтин-2 усиливает эффекты VEGF, приводит к ослаблению контактов между эндотелиальными клетками и перицитами, что позволяет эндотелиальным клеткам мигрировать, повышает проницаемость ГРБ. Ангиопоэтин-1 – антагонист ангиопоэтина-2 – способствует ассоциации перицитов и эндотелия, уменьшает проницаемость сосудов и обладает противовоспалительной активностью [16, 27, 46]. В стекловидном теле у больных

с непролиферативной ДР и ДМО концентрация проангиогенного ангиопоэтина-2 в 2 раза превышает концентрацию ангиопоэтина-1. Наиболее высокие уровни VEGF и ангиопоэтина-2 были отмечены у больных с препролиферативной и пролиферативной ДР [92, 167, 170].

Инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) усиливает активность промотера гена VEGF при помощи гипоксия-индуцибельного фактора (HIF $\alpha$ ) и, таким образом, вызывает повышение экспрессии VEGF, повышение уровня ICAM1, лейкостаз и повышение проницаемости ГРБ. Ген ICAM1 кодирует молекулы межклеточной адгезии 1-го типа, обеспечивающие высокоспецифичное взаимодействие между сосудистой стенкой и клетками крови. У больных с пролиферативной ДР лечение соматостатином (антагонистом IGF-1) блокирует фосфорилирование рецептора IGF-1 и снижает продукцию VEGF [92, 107, 167, 170].

Эффекты фактора роста фибробластов (FGF-2) были изучены на культурах клеток бычьего ретинального эндотелия: FGF-2 стимулирует пролиферацию, миграцию и выживание эндотелиальных клеток в присутствии PDGF, участвует в обеспечении ветвления новообразованных капилляров [27, 46, 107, 109, 167].

PEDF (фактор, выделяемый пигментным эпителием) является антагонистом ангиогенных факторов роста и выполняет защитную роль при ДР. У больных ДР содержание PEDF в стекловидном теле значительно снижено, а в плазме крови повышено. У больных с пролиферативной ДР на фоне повышенного уровня VEGF уровень PEDF в стекловидном теле ниже, чем у больных с непролиферативной ДР [107, 109, 167, 170].

Таким образом, ДР, как позднее осложнение СД, развивается вследствие потери капилляром ретинальных перицитов, и в результате стенка сосуда истончается и становится более проницаемой, что способствует развитию микроаневризм. Сосудистые нарушения приводят к формированию ишемии и инфаркта сетчатки, что ведет к стимуляции роста новых капилляров [139, 124, 126, 146, 147, 150, 152].

В настоящее время существуют различные точки зрения на возможность генетической обусловленности возникновения ДР. По данным исследований, ДР

встречается в 75 % случаев при продолжительности диабета 15 лет и более [82, 83], но изучение патогенеза нейрососудистых осложнений диабета позволяет выделить гены-кандидаты в возникновении и развитии ДР.

Рядом российских исследователей и в 2009 году австралийскими учеными был проведен мета-анализ результатов нескольких исследований, касающихся взаимосвязи между генетическими факторами риска и развитием диабетической ретинопатии. Авторами было проанализировано 702 публикации, 160 из которых были посвящены геномному полиморфизму при диабетической ретинопатии. Было выделено порядка 196 полиморфизмов 20 генов. Полиморфизмы по генам NOS3, AKR1B1, VEGF, ITGA2, ICAM1, ADRB3, APOE ассоциированы с диабетической ретинопатией. Ген AKR1B1 имеет наибольшее число полиморфизмов, связанных с диабетической ретинопатией. А в целом к ДР имеет отношение порядка 20 генов.

В нашем исследовании были подробно рассмотрены некоторые гены-кандидаты риска развития диабетической ретинопатии.

Ген AKR1B1 – кодирует фермент альдозоредуктазу, участвующую в метаболизме глюкозы и осморегуляции.

Ген эндотелиальной синтеза оксида азота (NOS3) ассоциирован с различными сосудистыми осложнениями при СД 1-го и 2-го типа [149, 153, 161].

Ген VEGF – фактор роста, центральный регулятор как физиологического, так и патологического ангиогенеза, играет важную роль в образовании новых сосудов при пролиферативной ретинопатии, способствуя увеличению проницаемости капилляров и диабетическому отеку макулы. Некоторые исследования подтвердили роль полиморфизма гена VEGF в формировании ДР [107, 110, 166, 190]. Неоретинальная васкуляризация связана с ретинальной ишемией и гипоксией, которые индуцируют продукцию VEGF.

Ген ITGA2 кодирует белок интегрин альфа-2 – мембранный гликопротеин, известный как GPIa (platelet glycoprotein Ia или very late activation protein (VLA)), экспрессирующийся на мембранах различных клеток, включая мегакариоциты, фибробласты и тромбоциты. На мембране тромбоцитов GPIa образует комплекс

GP1a, представляющий собой один из рецепторов коллагена. Благодаря интегринам тромбоциты образуют монослой в области поврежденных тканей, что является необходимым условием включения последующих звеньев свертывающей системы крови.

Ген ICAM1 кодирует молекулы межклеточной адгезии 1-го типа, представляющие собой связанные с плазматической мембраной белки, обеспечивающие высокоспецифичное взаимодействие между сосудистой стенкой и клетками крови. Молекулы клеточной адгезии имеют большое значение в процессе развития и поддержания целостности архитектуры тканей у взрослых. В нормальной ткани экспрессия молекулы клеточной адгезии жестко регулируется.

Ген ADRB3 кодирует адренергический бета-3 рецептор, который экспрессируется преимущественно в висцеральной жировой ткани, жировом депо и тесно связан с родственными ожирению метаболическими осложнениями.

Полиморфизм генов адренергических рецепторов может играть значительную роль в регуляции расхода энергии и липолиза. Установлено, что уменьшение активности ADRB3 приводит к замедлению окисления и повышенному накоплению жиров в белой жировой ткани за счет активации аденилатциклазы и усиления процессов липолиза в белой жировой ткани, а также продукции тепла в бурой жировой ткани, что может способствовать развитию ожирения.

Ген APOE кодирует аполипопротеин E, который входит в состав липопротеидов очень низкой, промежуточной и высокой плотности, а также ремнантов хиломикронов, и обеспечивает транспорт холестерина в печень и к тканям. Известно, что структура и концентрация в крови каждого аполипопротеина находится под генетическим контролем, в то время как содержание липидов и липопротеидов в большей степени подвержено влиянию диетических и других факторов.

Полиморфизм гена аполипопротеина E в исследованиях также подтвердил свое влияние на развитие ДР пациентов с СД 2-го типа [20]. Аполипопротеин E играет центральную роль в метаболизме липидов. Его основная функция –

транспорт холестерина к тканям от мест его синтеза или всасывания в составе ЛНП и ЛОНП.

Аполипопротеин E существует в трех изоформах:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  и  $\epsilon 4$ , которые кодируются одним геном APOE. Отличия между ними определяются двумя однонуклеотидными полиморфизмами (С/Т) в экзоне 4, которым соответствуют полиморфизмы аминокислотных остатков: цистеин или аргинин в положениях 112 и 158 аминокислотной последовательности аполипопротеина E. Анализ данных зарубежных исследований указывает на несомненную связь полиморфного маркера  $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$  гена APOE с развитием ДР при СД.

Изоформы APOE белка имеют разную эффективность связывания с рецептором к ЛПНП. APOE  $\epsilon 3$  встречается у 70–80 % людей и считается благоприятным вариантом. APOE  $\epsilon 2$  вариант встречается в 7–8 % случаев у европеоидов, имеет значительно меньшую связывающую способность к рецептору LPLR и, как следствие, замедление клиренса триглицеридов из плазмы. Гомозиготное носительство  $\epsilon 2/\epsilon 2$  приводит к значительно более длительному сохранению постпрандиальной липидемии. С гомозиготным носительством  $\epsilon 2$  связывают развитие гиперлипопротеинемии III типа.

Вариант APOE  $\epsilon 4$  обнаруживается у 14 % европеоидов, он ассоциирован с гиперхолестеринемией, более высоким уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности, является генетическим фактором риска сосудистых заболеваний.

Таким образом, анализ литературных источников свидетельствует о том, что диабетическая ретинопатия является многофакторным осложнением сахарного диабета и распространенной патологией сетчатой оболочки глаза, в патогенезе которой существенную роль играют генетические факторы.

Большое число проведенных исследований, касающихся механизмов развития диабетической ретинопатии, сформировали представление о ее патогенезе как о многокомпонентном, многофакторном и взаимосвязанном процессе.

По аналогии с многофакторным механизмом формирования ДР, генетическая предрасположенность также кодируется не одним геном, а

комплексом различных генов-кандидатов, кодирующих ключевые факторы поражения сетчатой оболочки глаза.

Проведенные исследования позволяют предполагать, что наиболее вероятные гены-кандидаты развития патологии – это гены вазоактивных факторов эндотелия и эндотелиальной дисфункции, факторов липидного обмена, воспаления и ангиогенеза, и гены, регулирующие инсулиновую секрецию.

В результате нашего исследования было установлено, что сочетание гомозиготы по более редкому варианту гена AKR1B1 (AA) с гетерозиготой гена VEGF (GC) или гомозиготой гена VEGF (GG) наблюдаются у 57 % и 50 % пациентов соответственно с наличием диабетической ретинопатии. При этом реже всего ДР развивалась у носителей «диких» вариантов полиморфизмов по двум генам одновременно: VEGF (CC) и AKR1B1 (GG) – 30 % пациентов. Невысокие частоты диабетической ретинопатии также наблюдали и при одновременном сочетании двух гетерозиготных вариантов генов VEGF и AKR1B1 (37 %).

При оценке качества данного прогноза было установлено, что точность метода составляет 55,6 %, чувствительность – 59,6 %, специфичность – 52,6 %, отношение шансов – 1,64 (1,13–2,36);  $\chi^2$  – 6,917 ( $p = 0,0085$ );  $\chi^2$  (попр. Йетса) – 6,437 ( $p = 0,011$ ); Карра – 0,12.

Данные характеристики не являются высокоточными, поэтому мы продолжили прогностический поиск, используя сочетание распределения генотипов полиморфных участков трех генов: VEGF rs2010963; AKR1B1 rs759853; APOE участок rs7412 и участок rs429358.

В результате было установлено, что некоторые сочетания генотипов участков трех генов определяют 100 % развития диабетической ретинопатии:

- сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3;
- сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2;

- сочетание гомозиготы по редкому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гомозиготой по редкому типу гена AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3;
- сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4;
- сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4.

При этом также установлены сочетания генотипов участков трех генов, определяющие отсутствие диабетической ретинопатии:

- сочетание гетерозиготы VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- сочетание гетерозиготы VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2;
- сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы;
- сочетание гомозиготы по редкому типу VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4;
- сочетание гомозиготы по дикому типу VEGF с гомозиготой по дикому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4;
- сочетание гомозиготы по дикому типу VEGF с гомозиготой по дикому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2;
- сочетание гомозиготы по дикому типу VEGF с гетерозиготой AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы.

При оценке качества данного прогноза было установлено, что точность метода составляет 62,0 %, чувствительность – 54,0 %, специфичность – 68 %, отношение шансов – 2,52 (1,73–3,66);  $\chi^2$  – 23,6 ( $p = 0,001$ );  $\chi^2$  (попр. Йетса) – 22,7 ( $p = 0,001$ ); Каппа – 0,23.



Полученные характеристики мы посчитали недостаточными и для дальнейшего улучшения прогноза риска развития диабетической ретинопатии воспользовались множественной логистической регрессией с пошаговым включением или исключением предикторов (предсказывающих переменных). В качестве возможных факторов риска рассматривали клинико-лабораторные данные пациентов, среди которых наиболее значимы на наш взгляд концентрация гликированного гемоглобина в крови, концентрация глюкозы в крови и стаж диабета.

Нами были получены три устойчивые модели, включающие выработанные программой MDR комбинации генотипов (две модели с сочетанием трех генотипов и одна модель с сочетанием двух генотипов), стаж сахарного диабета и уровень гликемии, оцененный либо по гликированному гемоглобину, либо по уровню глюкозы.

Модель 3, с учетом двух генов, стажа диабета, а также концентрации гликированного гемоглобина и глюкозы в крови имеет самые высокие прогностические характеристики: чувствительность – 78 %, специфичность – 74 %.

Таким образом, дополнительный учет концентрации гликированного гемоглобина и глюкозы в крови, а также стажа заболевания сахарным диабетом, помимо комбинации неблагоприятных генотипов по полиморфным участкам генов, позволил улучшить точность прогноза развития диабетической ретинопатии. В частности, повысилась чувствительность метода с 54 % при прогнозировании только по генетической предрасположенности до 74 % при учете комплекса факторов (генетическая предрасположенность + гипергликемия + стаж сахарного диабета).

Несомненно, основной предиктор – это стаж сахарного диабета, но и генетическая предрасположенность играет статистически значимую роль. Возможно, именно факторы наследственности влияют на особенности течения сахарного диабета и его клинические проявления в целом в организме.

На основании полученных данных разработана программа-калькулятор, позволяющая оценить состояние пациента на момент обследования и дать прогноз развития диабетической ретинопатии на основании учета генетических

факторов (полиморфизм генов AKR1B1 и VEGF) и результатов эндокринологического обследования (концентрация глюкозы и гликированного гемоглобина в крови) и анамнеза пациента (стаж диабета). На основании программы врач выстраивает тактику ведения пациента и терапию, реализуя персонализированный подход.

Программа прошла апробацию в офтальмоэндокринологическом отделении Самарской областной клинической офтальмологической больницы им. Т.И. Ерощевского» и показала хорошие результаты. Когортное исследование пациентов через год также происходило с использованием данной программы.

В результате когортного исследования пациентов с ДР для установления прогрессирования стадий ДР и изменения баллов по шкале ETDRS установлено, что по гену AKR1B1 в случае предположения доминантности 1-го аллеля (G) гомозиготы по более редкому аллелю A статистически значимо повышают риски ухудшения баллов по ETDRS за год (20 % против 13 %), ОШ = 1,69 (95 % ДИ: 1,00–2,83),  $p = 0,047$ .

При анализе прогноза увеличения баллов ETDRS у пациентов при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 было установлено следующее:

- сочетание гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 с гомозиготой C/C гена VEGF rs2010963 и сочетание гетерозиготы G/A гена AKR1B1 rs759853 с гетерозиготой G/C гена VEGF rs2010963 не ведет к развитию ДР (хороший прогноз);

- сочетания гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 с гетерозиготой G/C гена VEGF rs2010963; гетерозиготы G/A гена AKR1B1 rs759853 с гомозиготой по дикому типу C/C гена VEGF rs2010963 или гомозиготой по редкому аллелю G/G гена VEGF rs2010963, а также сочетание гомозиготы по редкому аллелю A/A гена AKR1B1 rs759853 и гомозиготы C/C по дикому типу не являются достоверными факторами в развитии ДР (неясный прогноз);

- сочетания гомозиготы G/G по дикому типу гена AKR1B1 rs759853 и гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963, гомозиготы A/A по

редкому аллелю гена AKR1B1 rs759853 и гетерозиготы G/C гена VEGF rs2010963 или гомозиготы G/G по редкому аллелю гена VEGF rs2010963 являются неблагоприятными и ведут к развитию ДР (плохой прогноз).

Анализ изменений за год у пациентов без ДР определяет вклад генетического фактора в развитие заболевания.

По генам VEGF и AKR1B1 установлено, что гомозиготы по более редкому аллелю с большей вероятностью получают ухудшения ETDRS в течение года с ОШ = 2,02 (1,01-4,01),  $p = 0,043$  и ОШ = 3,46 (1,56–7,68),  $p = 0,001$  соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о существенном вкладе генетических факторов в развитие и прогрессирование ДР, но следует помнить, что полиморфный маркер гена представляет собой вариабельный участок ДНК, носительство определенного варианта которого вызывает изменение продукта экспрессии гена (активность фермента или белка-транспортера), что, в свою очередь, непосредственно или, чаще всего, опосредованно изменяет некий фенотипический признак. Однако наличие аллеля или генотипа риска *per se* не приводит к развитию заболевания, только при определенной комбинации аллелей и генотипов генетическая предрасположенность может реализоваться в фенотип патологии под воздействием патологических средовых факторов, но вклад одного гена может быть ничтожно мал, поэтому перспективным в изучении генетических факторов представляет комплексный полигенный подход. В нашем исследовании установлено, что некоторые сочетания полиморфных участков генов VEGF и AKR1B1 провоцируют ухудшения баллов по шкале ETDRS в течение года и связаны с риском развития и прогрессирования ДР.

## ВЫВОДЫ

1. Длительность диабета и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии диабетической ретинопатии, однако возникновение сосудистых осложнений у ряда пациентов с хорошим гликемическим контролем и компенсированным сахарным диабетом, в отличие от больных с декомпенсированным заболеванием, означает вклад в развитие данной патологии ряда генетических факторов. В ходе мета-анализа результатов многочисленных исследований, касающихся взаимосвязи между генетическими факторами риска и развитием диабетической ретинопатии, выделено 196 полиморфизмов 20 генов, ассоциированных с развитием ДР. Полиморфизмы по генам NOS3, AKR1B1, VEGF, ITGA2, ICAM1, ADRB3, APOE ассоциированы с развитием диабетической ретинопатией. Ген AKR1B1 имеет наибольшее число полиморфизмов, связанных с диабетической ретинопатией.

2. Полиморфные локусы генов VEGF rs2010963, AKR1B1 rs759853, ITGA2 rs2910964, ADRB3 rs4994, APOE rs7412, APOE 429358, рассматриваемые независимо друг от друга, не связаны с развитием диабетической ретинопатии.

3. Установлено, что при оценке взаимосвязей двух генов сочетания гомозиготы по более редкому варианту гена AKR1B1 с гетерозиготой по редкому варианту гена VEGF или гомозиготой гена VEGF наблюдаются у пациентов с наличием диабетической ретинопатии. При оценке взаимосвязей трех генов установлено, что ряд сочетаний генотипов определяют 100 % развития диабетической ретинопатии: сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3; сочетание гетерозиготы VEGF с гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2; сочетание гомозиготы по редкому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы; сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гомозиготой по редкому типу гена AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e3; сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF с гетерозиготой гена AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4; сочетание гомозиготы по дикому

типу гена VEGF гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE гетерозиготы; сочетание гомозиготы по дикому типу гена VEGF гомозиготой по редкому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e4e4.

4. Диагностическая модель, на основе которой разработана программа-калькулятор, включающая комбинацию генотипов двух генов VEGF и AKR1B1, а также концентрацию гликированного гемоглобина и глюкозы в крови, стаж заболевания сахарным диабетом, имеет чувствительность 78 % и специфичность 74 %, что позволяет использовать ее в практической медицине для прогнозирования течения и развития диабетической ретинопатии. Разработанная программа-калькулятор позволяет оценить состояние пациента на момент обследования и дать прогноз развития диабетической ретинопатии на основании учета генетических факторов (полиморфизм генов AKR1B1 и VEGF), результатов эндокринологического обследования (концентрация глюкозы и гликированного гемоглобина в крови) и анамнеза пациента (стаж диабета).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с сахарным диабетом 2-го типа необходим осмотр офтальмологом сразу же (или как можно раньше) после выявления заболевания и анализ крови на наличие молекулярно-генетических маркеров развития диабетической ретинопатии.

2. Независимо от стадии диабетической ретинопатии и сопутствующих осложнений всем пациентам рекомендована максимально стабильная компенсация сахарного диабета, нормализация артериального давления и липидного профиля под контролем врача-эндокринолога-офтальмолога.

3. Если при первичном осмотре у пациента не выявлено диабетических изменений глаз, дальнейшие осмотры проводятся не реже одного раза в год. Но если у пациента установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета рассчитанная программой-калькулятором вероятность развития ДР ниже 40 %, то назначается стандартное офтальмологическое обследование ежегодно, а при вероятности более 40 % – каждые полгода.

4. Пациенты с сохраняющимся высоким уровнем гликемии (уровень гликированного гемоглобина  $> 9\%$ ) и артериальной гипертензией (артериальное давление выше 160/95 мм рт. ст.) должны осматриваться офтальмологом не реже одного раза в 6–8 месяцев даже при отсутствии патологических изменений на глазном дне при первичном осмотре. Если же у пациента установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при рассчитанной программой-калькулятором вероятность развития ДР ниже 40 %, то назначается стандартное офтальмологическое обследование не реже одного раза в 6–8 месяцев, а при вероятности более 40 % – каждые 3 месяца.

5. Офтальмологическое обследование женщин, страдающих сахарным диабетом 2-го типа и пожелавших иметь ребенка, необходимо проводить до зачатия (в период планирования беременности) и каждые 3 месяца после

подтверждения беременности. Если у женщины установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при рассчитанной программой-калькулятором вероятность развития ДР ниже 40 %, рекомендовано стандартное офтальмологическое обследование каждые 3 месяца, а при вероятности более 40 % – каждый месяц.

6. При терапии диабетической ретинопатии у пациентов с установленным сочетанием генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при рассчитанной программой-калькулятором вероятности развития ДР ниже 40 %, необходимо использовать стандартный протокол офтальмологического ведения больных с сахарным диабетом, а при вероятности более 40 % – рекомендовано уменьшение сроков повторных приемов для контроля терапии в среднем в 2 раза и применение анти-VEGF-препаратов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- ADRB3 – адренергический бета-3 рецептор
- FGF-2 – фактор роста фибробластов
- HIF $\alpha$  – гипоксия-индуцибельный фактор
- ICAM1 – молекула межклеточной адгезии 1-го типа
- IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста
- MDR – multifactor dimensionality reduction
- NO – оксид азота
- OD – острота зрения правого глаза
- ONOO<sup>-</sup> – пероксинитрит
- OS – острота зрения левого глаза
- PAI – ингибиторы активации плазминогена
- PDGF – тромбоцитарный фактор роста
- PEDF – фактор, выделяемый пигментным эпителием
- PlGF – плацентарный фактор роста
- SNP – единичная нуклеотидная замена
- TGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста
- TIMP – тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ
- VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
- VEGF-A – ангиогенные факторы
- Apo E – аполипопротеин E
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ВГД – внутриглазного давления
- ВМД – возрастная макулярная дегенерация
- ДИ – доверительный интервал
- ДМО – диабетический макулярный отек
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДР – диабетическая ретинопатия



ИВВА – интравитреальное введение «Авастина»  
ИВВК – интравитреальное введение «Кеналога»  
ИРМА – интравитреальные микрососудистые аномалии  
КПГ – конечные продукты гликирования  
ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности  
ЛПВП – липопротеины высокой плотности  
ЛПНП – липопротеины низкой плотности  
МО – макулярный отек  
НПДР – непролиферативная диабетическая ретинопатия  
ОКТ – оптическая когерентная томография  
ОКТ-А – оптическая когерентная томография-ангиография  
ОШ – отношение шансов  
ПДР – пролиферативная диабетическая ретинопатия  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
ПРЛКС – панретиальная лазеркоагуляция сетчатки  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РДИ – реактивные дикарбонильные интермедиаты  
С – цитозин  
СД – сахарный диабет  
Т – тимин  
ТГ – триглицериды  
ФАГ – флуоресцентная ангиография  
ФАГД – флуоресцентная ангиография глазного дна  
ФАЗ – фовеальная аваскулярная зона  
ХС – холестерин

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алексеев, И.Б. К вопросу о роли окислительного стресса в патогенезе диабетической ретинопатии при сахарном диабете II типа [Текст] / И.Б. Алексеев, С.А. Кочергин, И.В. Воробьева // Российский офтальмологический журнал. – 2013. – Т. 6. – № 4. – С. 99–102.
2. Алексеев, И.Б. Результаты применения антиоксидантной терапии у пациентов с непролиферативной диабетической ретинопатией при сахарном диабете 2-го типа [Текст] / И.Б. Алексеев, И.В. Воробьева, Л.Г. Михалева // Вестник офтальмологии. – 2013. – Т. 129. – № 6. – С. 66–71.
3. Алексеева, Л.Л. Гемодинамические изменения при диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом [Текст] / Л.Л. Алексеева, А.П. Ноева // Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М. К. Аммосова. – 2010. – Т. 7. – № 4. – С. 27–31.
4. Аметов, А.С. Современные подходы к лечению сахарного диабета 2-го типа и его осложнений [Текст] / А.С. Аметов, Е.В. Доскина // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 3. – С. 61–64.
5. Амиров, А.Н. Диабетический макулярный отек: эпидемиология, патогенез, диагностика, клиническая картина, лечение [Текст] / А.Н. Амиров, Э.А. Абдулаева, Э.Л. Минхузина // Казанский медицинский журнал. – 2015. – № 1 (96). – С. 70–76.
6. Анализ влияния структурной перестройки промотора гена NOS3 на продукцию вазоактивных эндотелиальных факторов [Текст] / А.В. Хромова [и др.] // Журнал медико-биологических исследований (с 2017 года). – 2015. – № 4. – С. 107–115.
7. Анализ частоты мутации генов, ассоциированных с диабетической ретинопатией, в поволжской популяции [Электронный ресурс] / А.Г. Исхакова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 6. – Режим

доступа: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29283>. – Загл. с экрана (Дата обращения: 09.01.2021).

8. Ангиогенез при пролиферативной диабетической ретинопатии: перспективы анти-VEGF-терапии (обзор литературы) [Текст] / В.И. Коненков [и др.] // Офтальмохирургия. – 2013. – № 4. – С. 111–115.

9. Анти-VEGF препараты в лечении диабетического макулярного отека [Текст] / В.И. Коненков [и др.] // Офтальмология. Сахарный диабет. – 2013. – № 4. – С. 78–84.

10. Анти-VEGF препараты для лечения диабетической ретинопатии [Текст] / А.Г. Кузьмин [и др.] // Офтальмология. – 2009. – № (3). – С. 53–57.

11. Антиоксидантная терапия непролиферативной диабетической ретинопатии [Текст] / Ю.А. Трахтенберг [и др.] // Врач. – 2006. – № 11. – С. 15–18.

12. Ассоциации вариантов гена фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и генов цитокинов (IL-1B, IL-4, IL-6, IL-10, TNF A) с сахарным диабетом 2-го типа у женщин [Текст] / В.И. Коненков [и др.] // Сахарный диабет. – 2012. – № 3. – С. 4–10.

13. Ассоциация генов ITGB3 и NOS3 с тяжестью течения ишемической болезни сердца при наличии и отсутствии сахарного диабета 2-го типа [Текст] / Э.Ф. Муслимова [и др.] // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19. – № 4. – С. 303–308.

14. Ассоциация полиморфизмов I/D и T-786C генов ACE и NOS3 с особенностями течения ишемической болезни сердца на фоне сахарного диабета 2-го типа [Текст] / С.А. Афанасьев [и др.] // Кардиология. – 2016. – С. 5–10.

15. Астахов, Ю.С. Диабетическая ретинопатия (тактика ведения пациента) [Текст] / Ю.С. Астахов, Ф.Е. Шадричев, А.Б. Лисочкина // Клиническая офтальмология. – 2004. – № 2. – С. 85–88.

16. Астахов, Ю.С. Роль дисфункции эндотелия в патогенезе сосудистых заболеваний органа зрения [Текст] / Ю.С. Астахов, С.Н. Тульцева, А.И. Титаренко // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2016. – № 4. – С. 5–16.

17. Балаболкин, М.И. Профилактика сосудистых осложнений сахарного диабета [Текст] / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Клиническая эндокринология. – 2008. – № 2. – С. 23–25.

18. Балашевич, Л.И. Диабетическая офтальмопатия [Текст] / Л.И. Балашевич, А.С. Измайлов. – СПб.: Человек, 2012. – 336 с.

19. Бахарева, Ю.С. Гемодинамические, биохимические, воспалительные, ростовые факторы у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и доклинической диабетической нефропатией [Текст] / Ю.С. Бахарева, О.Д. Рымар, Н.Н. Чапаева // Лечение и профилактика. – 2016. – № 2. – С. 77–83.

20. Бездетко, П.А. Лекарственная терапия диабетической ретинопатии на этапах ее развития (проблемы, сомнения, решения) [Текст] / П.А. Бездетко // Офтальмология Восточная Европа. – 2016. – № 1 (28). – С. 109–123.

21. Бойко, Е.Р. Апопротеин Е и его значение в клинической физиологии [Текст] / Е.Р. Бойко, А.М. Канева // Успехи физиологических наук. – 2009. – Т. 40. – № 1. – С. 3–15.

22. Бойко, Е.Р. Функциональное значение аполипопротеина-Е в липидном обмене у жителей европейского Севера [Текст] / Е.Р. Бойко, А.М. Канева, Н.Н. Потолицына // Физиология человека. – 2010. – Т. 36. – № 2. – С. 138–144.

23. Величко, П.Б. Комбинированное хирургическое лечение диабетического макулярного отека и катаракты [Текст] / П.Б. Величко, О.Л. Фабрикантов // Актуальные проблемы офтальмологии: 7 Всерос. науч. конф. молодых ученых: сб. науч. работ ; под ред. Б.Э. Малюгина. – М.: Офтальмология, 2012. – С. 52–54.

24. Величко, П.Б. Современные методические подходы к лечению диабетической ретинопатии [Текст] / П.Б. Величко, Э.М. Османов // Вестник ТГУ. – 2013. – Т. 18. – № 6. – С. 3248–3249.

25. Величко, П.В. Комплексное лечение диабетического макулярного отека. [Текст] / П.В. Величко // Вестник ТГУ. – 2014. – № 14 (19). – С. 1097–1101.

26. Ветров, Ю.Д. Клинико-лабораторная характеристика ранних стадий диабетической ретинопатии у больных инсулинозависимым сахарным диабетом

[Текст] / Ю.Д. Ветров // VII съезд офтальмологов России : тез. докл. – М., 2000. – Ч. 1. – С. 422.

27. Воробьева, И.В. Диабетическая ретинопатия у больных сахарным диабетом второго типа. Эпидемиология, современный взгляд на патогенез. Обзор [Текст] / И.В. Воробьева, Д.А. Меркушенкова // Офтальмология. – 2012. – Т. 9. – № 4. – С. 18–21.

28. Галиева, О.Р. Лечение диабетической нейропатии [Текст] / О.Р. Галиева, П.Х. Джанашия, Е.Ю. Мирина // Международный неврологический журнал. – 2008. – Т. 17. – № 1. – С. 49–53.

29. Генетика сахарного диабета у детей и подростков: пособие для врачей [Текст] / И.И. Дедов [и др.]; под общ. ред. И.И. Дедова. – М., 2003. – 74 с.

30. Генетические маркеры развития диабетической ретинопатии [Текст] / А.В. Шулькин [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 4. – Ч. 2. – С. 411–414.

31. Генетические факторы в развитии хронической болезни почек при сахарном диабете [Текст] / О.К. Викулова [и др.] // Генетика. – 2017. – Т. 53. – № 4. – С. 411–425.

32. Генетические факторы индукции нарушений регуляции ангиогенеза при сахарном диабете 2-го типа [Текст] / В.И. Коненков [и др.] // Медицинская иммунология. – 2012. – № 6. – С. 489–500.

33. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

34. Гогина, И.Ф. Состояние энергетического обмена при диабетической ангиоретинопатии [Текст] / И.Ф. Гогина, Е.В. Плешанов, П.Д. Горгий // Офтальмологический журнал. – 1989. – № 2. – С. 96–98.

35. Дедов, И.И. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы» [Текст] / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – М., 2012. – 144 с.

36. Ермакова, Н.А. Диабетическая ретинопатия. Клиника, диагностика, классификация, лечение [Текст] / Н.А. Ермакова // Клиническая офтальмология. – 2013. – № 1. – С. 33.

37. Ефимов, А.С. Клиническая диабетология [Текст] / А.С. Ефимов, Н.А. Скробонская. – 1-е изд. – Киев: Здоровья, 1998. – С. 5. – 320 с.

38. Железнякова, А.В. Польша Лангерганс. 140 лет открытия островков поджелудочной железы [Текст] / А.В. Железнякова // Сахарный диабет. – 2009. – № 2.

39. Животовский, Л.А. Популяционная биометрия [Текст] / Л.А. Животовский. – М.: Наука, 1991. – 271 с.

40. Измайлов, А.С. Диабетическая ретинопатия. Глазные проявления диабета [Текст] / А.С. Измайлов, Л.И. Балашевич. – СПб.: СПбМАПО, 2004. – С. 123–213.

41. Изменение функции нейронов сетчатки и глиальных клеток Мюллера у больных сахарным диабетом 2-го типа при лечении диабетической ретинопатии ингибитором ангиотензинпревращающего фермента [Текст] / М.В. Зуева [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2013. – № 3. – С. 44–47.

42. Исхакова, А.Г. Роль генетических факторов риска в развитии диабетической ретинопатии [Текст] / А.Г. Исхакова // Вестник медицинского института «Реавиз». – 2018. – № 5. – С. 41–49.

43. Ищенко, И.А. Эффективность применения антиоксидантов в лечении диабетической ретинопатии [Текст] / И.А. Ищенко, Т.М. Миленьякая // Клиническая офтальмология. – 2007. – Т. 8. – № 3. – С. 97–101.

44. Клинические и метаболические факторы, ассоциированные с хроническим воспалением низкой интенсивности, у больных сахарным диабетом 2-го типа [Текст] / В.В. Климонтов [и др.] // Сахарный диабет. – 2016. – № 19 (4). – С. 295–301.

45. Комбинации полиморфизмов в регуляторных участках генов цитокинов ассоциированы с диабетической ретинопатией у больных сахарным диабетом 2-го типа [Текст] / В.И. Коненков [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – № 16 (4). – С. 173–183.

46. Коненков, В.И. Ангиогенез и васкулогенез при сахарном диабете: новые концепции патогенеза и лечения сосудистых заболеваний [Текст] / В.И. Коненков, В.В. Климонтов // Сахарный диабет. – 2012. – № 15 (4). – С. 17–27.

47. Коненков, В.И. Ангиогенез при пролиферативной диабетической ретинопатии: перспективы анти-vegf-терапии (обзор литературы) [Текст] / В.И. Коненков, В.В. Климонтов, В.В. Черных // Офтальмохирургия. – 2013. – № 4. – С. 111–115.

48. Консервативное лечение диабетического макулярного отека [Текст] / Н.В. Яблокова [и др.] // Практическая медицина. – 2012. – № 4 (59). – Т. 2. – С. 156–158.

49. Крыжановская, Т.В. Патогенетические аспекты реабилитации больных диабетической ретинопатией [Текст] / Т.В. Крыжановская // Современные аспекты сосудисто-эндокринных заболеваний органа зрения: материалы 2-й между нар. конф. – Киев, 2005. – С. 73–74.

50. Кузьмин, А.Г. Анти-VEGF препараты для лечения диабетической ретинопатии [Текст] / А.Г. Кузьмин [и др.] // Офтальмохирургия. – 2009. – № 3. – С. 34–37.

51. Мальцев, Э.В. Васкуляризация, аваскулярность и степени нейродегенеративных изменения сетчатки при сахарном диабете [Текст] / Э.В. Мальцев, А.В. Зборовская, А.Э. Дорохова // XIII з'їзд офтальмологів України, 21-23 травні 2014. – Одесса, 2014. – С. 186–187.

52. Мальцев, Э.В. Роль непосредственной васкуляризации сетчатки в нейропротекции ее структур при развитии диабетической нейропатии [Текст] / Э.В. Мальцев, А.В. Зборовская, А.Э. Дорохова // Филатовские чтения – 2015: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 140-летию со дня рождения акад. В.П. Филатова, 21-22 мая 2015 г. – Одесса, 2015. – С. 131–132.

53. Мартопляс, К.В. Деформація сітківки в області макули у хворих на цукровий діабет II типу після факоемульсифікації катаракти [Текст] / К.В. Мартопляс, М.П. Кульбіда // Філатовські читання – 2015 : матеріали наук.-

практ. конф. з між - нар. участю, присвячена 140-річчю з дня народження акад. В.П. Філатова, 21-22 травня 2015 р. – Одеса, 2015. – С. 132.

54. Маслова, О.В. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений [Текст] / О.В. Маслова, Ю.И. Сунцов // Сахарный диабет. – 2011. – № 3. – С. 7–11.

55. Могилевский, С.Ю. Связь полиморфизмов RS759853 и RS9640883 гена AKR1B1 с клинико-лабораторными показателями при диабетической ретинопатии [Текст] / С.Ю. Могилевский, О.В. Бушуева, С.В. Зяблицев // Офтальмология. Восточная Европа. – Минск. – Т. 7. – № 1. – 2017. – С. 8–17.

56. Науменко, В.А. Критерии ранней диагностики пролиферативной стадии диабетической ретинопатии [Текст] / В.А. Науменко, Н.Н. Крыжова // Офтальмология. Восточная Европа. – 2013. – № 1 (16). – С. 82–87.

57. Нероев, В.В. Диагностика и лечение диабетической ретинопатии и диабетического макулярного отека [Текст] / В.В. Нероев // Российский офтальмологический журнал. – 2014. – Т. 7. – № 3. – С. 71–84.

58. Нероев, В.В. Изменение функциональной активности сетчатки и гемодинамики глаза у пациентов с тяжелыми стадиями диабетической ретинопатии [Текст] / В.В. Нероев, А.А. Колчин, М.В. Зуева // Российский офтальмологический журнал. – 2014. – Т. 7. – № 3. – С. 19–26.

59. Нестеров, А.П. Диабетическая ретинопатия [Текст] / А.П. Нестеров // Русский медицинский журнал. – 2000. – Т. 8. – № 1. – С. 3–9.

60. Никберг, И.И. Вклад отечественных ученых-медиков в теоретическую и клиническую диабетологию [Текст] / И.И. Никберг // Диабет: Образ жизни. – 2013. – № 2. – С. 38–43.

61. Олейник, Т.В. Состояние процессов гашения свободно-радикальных форм кислорода в сетчатке при развитии экспериментального диабета [Текст] / Т.В. Олейник // Офтальмологический журнал. – 2006. – № 6. – С. 50–52.

62. Павлюченко, К.П. Влияние витамина В6 на процессы пероксидации и гликозилирования у больных диабетической ретинопатией [Текст] /



К.П. Павлюченко, С.Ю. Могилевский, А.Л. Чуйко // Офтальмологический журнал. – 2012. – № 4. – С. 52–56.

63. Патогенетическое значение однонуклеотидного полиморфизма С774Т гена эндотелиальной NO-синтазы в развитии метаболического синдрома [Текст] / Н.С. Фаттахов [и др.] // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62. – Вып. 4. – С. 447–452.

64. Повышенная концентрация воспалительных цитокинов в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 2-го типа с хронической болезнью почек [Текст] / В.И. Коненков [и др.] // Терапевтический архив. – 2015. – № 87 (6). – С. 45–49.

65. Полиморфизм гена АРОЕ и литогенность желчи у женщин с желчнокаменной болезнью [Текст] / И.Н. Григорьева [и др.] // Гастроэнтерология. – 2009. – № 8. – С. 56–60.

66. Полякова, М.А. Современные представления о патогенетических механизмах развития диабетической оптической нейропатии [Текст] / М.А. Полякова, Н.А. Гаврилова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2012. – № 3. – С. 129–132.

67. Протеолитически неактивные рекомбинантные формы урокиназы подавляют миграцию эндотелиальных клеток [Текст] / И.Б. Белоглазова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 12 (156). – С. 715–719.

68. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica [Текст] / О.Ю. Реброва. – М.: Медиасфера, 2002. – 312 с.

69. Региональные особенности полиморфизма генов, ассоциированных с ожирением (rs9939609 гена FTO и Trp64Arg гена ADRB3), у населения России [Текст] / А.К. Батулин [и др.] // Вопросы питания. – 2014. – № 2. – С. 35–41.

70. Репкина, М.Ю. Оксид азота в патогенезе диабетической ретинопатии [Текст] / М.Ю. Репкина // Российская педиатрическая офтальмология. – 2010. – № 3. – С. 24–28.

71. Роль LEU28/28PRO полиморфизмов гена APOE в регуляции липидного обмена у высококвалифицированных спортсменов республики Адыгея [Текст] / Д.В. Муженя [и др.] // Вестник Адыгейского государственного университета. – 2013. – № 1 (116). – С. 73–80.

72. Роль рецепторов VEGFR в неопластическом ангиогенезе и перспективы терапии опухолей мозга [Текст] / А.А. Корчагина [и др.] // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – № 12 (187). – С. 244–249.

73. Роль факторов роста сосудов в развитии диабетической ретинопатии и макулярного отека [Текст] / А.Г. Исхакова [и др.] // Российский офтальмологический журнал. – 2018. – № 11 (2). – С. 62–69.

74. Романенко, И.А. Диабетический макулярный отек. Классификация, клиника, лечение [Текст] / И.А. Романенко, В.В. Черкасова, Е.А. Егоров // РМЖ. Клиническая Офтальмология. – 2010. – Т. 11. – № 1. – С. е.3033.

75. Сарыгина, О.И. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста в патогенезе диабетической ретинопатии [Текст] / О.И. Сарыгина, В.В. Нероев, О.А. Левкина // Вестник офтальмологии. – 2009. – № 2. – С. 58–60.

76. Сдобникова, С.В. Патогенетические особенности и методы лечения различных стадий диабетической ретинопатии [Текст] / С.В. Сдобникова, К.А. Мирзабекова // Вестник офтальмологии. – 2013. – № 3. – С. 54–57.

77. Скибчик, В.А. Риск микро- и макрососудистых осложнений у больных сахарным диабетом [Текст] / В.А. Скибчик, Т.М. Соломенчук // Международный эндокринологический журнал. – 2006. – № 1. – С. 61–68.

78. Смирнова, О.М. Диабетическая ретинопатия. Современные проблемы [Текст] / О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2008. – № 3. – С. 12–15.

79. Стаценко, М.Е. Эффективность добезилата кальция в комплексной терапии диабетических микроангиопатий [Текст] / М.Е. Стаценко, Н.В. Соболевская // Consilium medicum. – 2012. – № 1. – С. 70–75.

80. Тихонович, М.В. Роль эндотелиального фактора роста сосудов в физиологии сетчатки [Текст] / М.В. Тихонович, Е.Э. Иойлева // Вестник оренбургского государственного университета. – 2015. – № 12 (187). – С. 244–249.

81. Цисельский, Ю.В. Биохимия глазных осложнений сахарного диабета [Текст] / Ю.В. Цисельский // Офтальмологический журнал. – 2004. – № 3. – С. 11–16.
82. Чак, Т.А. Генетические аспекты сахарного диабета 2-го типа [Текст] / Т.А. Чак // Лечебное дело. – 2014. – № 6 (40). – С. 58–65.
83. Чак, Т.А. Патопфизиология нейрососудистых осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа [Текст] / Т.А. Чак // Лечебное дело. – 2013. – № 3 (31). – С. 65–70.
84. Частота встречаемости полиморфизмов генов системы гемостаза у больных с тромбоэмболией легочной артерии [Текст] / А.И. Субботовская [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2013. – № 3 (55). – С. 70–75.
85. Чеберда, А.Е. Фармакоэкономический анализ применения ранибизумаба и афлиберцепта для лечения пациентов с диабетическим макулярным отеком [Текст] / А.Е. Чеберда, Д.Ю. Белоусов, М.М. Шишкин // Качественная клиническая практика. – 2017. – № 4. – С. 17–30.
86. Чиж, Л.В. Диабетический макулярный отек (обзор литературы) [Текст] / Л.В. Чиж // Офтальмохирургия и терапия. – 2004. – Т. 4. – № 3. – С. 47–54.
87. Шадричев, Ф.Е. Использование анти-VEGF терапии в лечении диабетического макулярного отека [Текст] / Ф.Е. Шадричев, Е.Б. Шкляр, Н.Н. Григорьева // Офтальмологические ведомости. – 2011. – Т. IV. – № 1. – С. 83–93.
88. Шестакова, М.В. Современный подход к профилактике и лечению диабетической ретинопатии: результаты исследования DIRECT [Текст] / М.В. Шестакова, М.Ш. Шамхалова // Справочник поликлинического врача. – 2009. – № 1. – С. 37–39.
89. Шуко, А.Г. Изменение уровня внутриглазных цитокинов у пациентов с сосудистой и неоваскулярной патологией сетчатки в зависимости от активности патологического процесса [Текст] / А.Г. Шуко, Н.В. Зайцева, И.В. Злобин // Вестник офтальмологии. – 2013. – Т. 129. – № 3. – С. 74–77.
90. Эндокринология и метаболизм в 2 томах [Текст] / под ред. Ф. Фелига [и др.]. – М.: Медицина, 1985.

91. Эпидемиологические аспекты поражения сетчатки у больных сахарным диабетом (результаты скрининга диабетической ретинопатии в Санкт-Петербурге) [Текст] / Ф.Е. Шадричев [и др.] // Офтальмологические ведомости. – 2009. – № 4 (2). – С. 13–18.

92. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes [Text] / T. Awata [et al.] // Diabetes. – 2002. – Vol. 51. – P. 1635–1639.

93. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy [Text] / S. Abhary [et al.] // Diabetes. – 2009. – Vol. 58 (9). – P. 2137–2147.

94. Adamiec-Mroczek, J. Proliferative diabetic retinopathy-the influence of diabetes control on the activation of the intraocular molecule system [Text] / J. Adamiec-Mroczek, J. Oficjalska-Mlynczak, M. Misiuk-Hojlo // Diabetes Research and Clinical Practice. – 2009. – Vol. 21. – P. 145–148.

95. Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema [Text] / J.A. Wells [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2015. – Vol. 372. – № 13. – P. 1193–1203.

96. Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema: Two-Year Results from a Comparative Effectiveness Randomized Clinical Trial [Text] / J.A. Wells [et al.] // Ophthalmology. – 2016. – Vol. 123. – P. 1351–1359.

97. Ahmed F. N. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus [Text] / F.N. Ahmed, F.N. Naqvi, F. Shafiq // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 1084. – P. 481–489.

98. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels [Text] / B. Rigat [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 1990. – Vol. 86. – P. 1343–1346.

99. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor comparative effectiveness trial for diabetic macular edema [Text] / L. Jampol [et al.] // JAMA Ophthalmology. – 2016. – Vol. 134 (12). – P. 1429.

100. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema [Text] / D.S. Boyer [et al.] // *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*. – 2013. – № 4 (6). – P. 151–169.

101. Apolipoprotein E genetic polymorphism, remnant lipoproteins, and nephropathy in type 2 diabetic patients [Text] / M. Eto [et al.] // *American Journal of Kidney Diseases*. – 2002. – Vol. 40. – P. 243–251.

102. Apolipoprotein E genotype and plasma lipid levels in Caucasian diabetic patients [Text] / L. Morbois-Trabut [et al.] // *Diabetes & Metabolism*. – 2006. – Vol. 32. – P. 270–277.

103. Apolipoprotein E polymorphism in the Tunisian population: frequency and effect on lipid parameters [Text] / R. Jemaa [et al.] // *Clinical Biochemistry*. – 2006. – Vol. 39. – P. 816–820.

104. Apolipoprotein E polymorphism in type 2 diabetic patients of Talca [Text] / E. Leiva [et al.] // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2005. – Vol. 68. – P. 244–249.

105. Apolipoprotein E polymorphism modifies the alcohol-HDL association observed in the National Heart, Lung and Blood Institute Family Heart Study [Text] / L. Djousse [et al.] // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2004. – Vol. 80. – P. 1639–1644.

106. Association of beta3-adrenergic receptor (ADRB3) Trp64Arg gene polymorphism with obesity and metabolic syndrome in the Balinese: a pilot study [Text] / S.G. Malik [et al.] // *BMC Research Notes*. – 2011. – Vol. 4. – № 1. – P. 167.

107. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients [Text] / M. Buraczynska [et al.] // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2007. – Vol. 22 (3). – P. 827–832.

108. Audrey B. Davis, *Circulation Physiology and Medical Chemistry in England 1650–1680* [Text] / Audrey B. Davis. – Lawrence, Kansas, 1973.

109. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab [Text] / N. Papadopoulos [et al.] // *Angiogenesis*. – 2012. – Vol. 15 (2). – P. 171–185.

110. Blanco, R. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection [Text] / R. Blanco, H. Gerhardt // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 1–19.

111. Bloomgarden, Z.T. Diabetic retinopathy and diabetic neuropathy [Text] / Z.T. Bloomgarden // Diabetes Care. – 2007. – Vol. 30. – № 3. – P. 760–765.

112. Bragge, P. Screening for presence or absence of diabetic retinopathy: a meta-analysis [Text] / P. Bragge, R.L. Gruen, M. Chau // Archives of Ophthalmology. – 2011. – Vol. 129. – P. 435–444.

113. Caballero, S. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells [Text] / S. Caballero, N. Sengupta, A. Afzal // Diabetes. – 2007. – Vol. 56. – P. 960–967.

114. Cai, X-L. Risk factors of diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients [Text] / X-L. Cai, F. Wang, L. Ji // Chinese Medical Journal. – 2006. – Vol. 119. – № 10. – P. 822–826.

115. Cheung, N. Diabetic retinopathy [Text] / N. Cheung, P. Mitchell, T.Y. Wong // Lancet. – 2010. – Vol. 376. – P. 124–136.

116. Clinically significant macular edema and survival in type 1 and type 2 diabetes [Text] / F.E. Hirai [et al.] // American Journal of Ophthalmology. – 2008. – Vol. 145. – P. 700–706.

117. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain [Text] / A. Louissaint [et al.] // Neuron. – 2002. – Vol. 34. – № 6. – P. 945–960.

118. DCCT Research Group. Clustering of long term complications in families with diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial [Text] // Diabetes. – 1997. – Vol. 46. – P. 1829–1839

119. De Falco, S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity [Text] / S. De Falco // Experimental & Molecular Medicine. – 2012. – Vol. 44. – № 1. – P. 1–9.

120. Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic loci regulating glucose and insulin metabolism in humans [Text] / E. Ingelsson [et al.] // *Diabet.* – 2010. – Vol. 59. – P. 1266–1275.

121. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment [Text] / N. Bhagat [et al.] // *Survey of Ophthalmology.* – 2009. – Vol. 1 (54). – P. 1–32.

122. Diabetic retinopathy clinical research network. Retinal thickness on Stratus optical coherence tomography in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy [Text] / N.M. Bressler [et al.] // *American Journal of Ophthalmology.* – 2008. – Vol. 145. – № 5. – P. 894–901.

123. Diabetic Retinopathy Research Group Vienna. A systematic correlation between morphology and functional alterations in diabetic macular edema [Text] / G.G. Deák [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2010. – Vol. 51. – № 12. – P. 6710–6714.

124. DIRECT Programme Study Group. Effect of Candesartan on progression and regression retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial [Text] / A.K. Sjolie [et al.] // *Lancet.* – 2008. – Vol. 372. – P. 1385–1393.

125. Dorin, G. The treatment of diabetic retinopathy (DR): Laser surgery or laser therapy? [Text] / G. Dorin // *Retina Today.* – 2008. – Vol. 6. – № 1.

126. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy [Text] / C.D.A. Stehouwer [et al.] // *Cardiovascular Research.* – 1997. – Vol. 34. – P. 55–68.

127. Evolution of neovascularization in mice with overexpression of vascular endothelial growth factor in photoreceptors [Text] / T. Tobe [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 1998. – Vol. 39. – № 1. – P. 180–188.

128. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress [Text] / N. Ferrara // *Endocrine Reviews.* – 2004. – Vol. 25. – P. 581–611.

129. Gálvez, M.I. Rubosixtaurin and other PKC inhibitors in diabetic retinopathy and macular edema [Text] / M.I. Gálvez // *Current Diabetes Reviews.* – 2009. – Vol. 5. – № 1. – P. 14–17.

130. Giove, T.J. Increased neuronal nitric oxide synthase activity in retinal neurons in early diabetic retinopathy [Text] / T.J. Giove, M.M. Deshpande, C.S. Gagen // *Molecular Vision*. – 2009. – Vol. 15. – P. 2249–2258.

131. Guidelines for the Management of Diabetic Macular Edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA) [Text] / U. Schmidt-Erfurth [et al.] // *Ophthalmologica*. – 2017. – Vol. 237 (4). – P. 185–222.

132. Hashim, Z. Osmotic stress induced oxidative damage: possible mechanism of cataract formation in diabetes [Text] / Z. Hashim, S. Zarina // *Journal of Diabetes and its Complications*. – 2012. – Vol. 26. – № 4. – P. 275–279.

133. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow [Text] / L. Yang [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 106 (2). – P. 584–592.

134. Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema [Text] / H. Funatsu [et al.] // *American Journal of Ophthalmology*. – 2002. – Vol. 1 (133). – P. 70–77.

135. Jusufbegovic, D. Evolution of controlling diabetic retinopathy: changing trends in the management of diabetic macular edema at a single institution over the past decade [Text] / D. Jusufbegovic, M.O. Mugavin, S. Schaal // *Retina*. – 2015. – Vol. 35. – № 5. – P. 929–934.

136. Kirchhof, M. A Historical Perspective of the Diagnosis of Diabetes [Text] / M. Kirchhof, N. Popat, J. Malowany // *Diagnostic Review*. – 2008. – № 78 (1).

137. Kowluru, R.A. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9 [Text] / R.A. Kowluru, Q. Zhong, J.M. Santos // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2012. – Vol. 21. – № 6. – P. 797–805.

138. Leal, E.C. Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy [Text] / E.C. Leal, A. Manivannan, K-I. Hosoya // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2007. – Vol. 48. – P. 5257–5265.

139. Lindholm, E. Candidate genes for late diabetic complications: academic dissertation [Text] / E. Lindholm. – Malmö, Sweden, 2007. – 117 p.



140. Long-term Results of Kumamoto Study on Optimal Diabetes Control in Type 2 Diabetes Patients [Text] / M. Shichiri [et al.] // *Diabetes Care*. – 2000. – Vol. 23. Suppl. 2. – P. B21–B29.

141. Lotery, A.J. Long-term therapies for diabetic macular edema [Text] / A.J. Lotery // *European Ophthalmic Review*. – 2012. – Vol. 6. – № 4. – P. 236–241.

142. Maessen, D.E.M. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases [Text] / D.E.M. Maessen, C.D.A. Stehouwer, C.G. Schalkwijk // *Clinical Science*. – 2015. – Vol. 128. – № 12. – P. 839–861.

143. MetaAnalysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [Text] / J.W.Y Yau [et al.] // *Diabetes Care*. – 2012. – Vol. 35. – P. 556–564.

144. Murakami, T. Structural changes in individual retinal layers in diabetic macular edema [Text] / T. Murakami, N. Yoshimura // *Journal of Diabetes Research*. – 2013. – P. 920713.

145. Muranaka, K. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and its ligand on blood-retinal barrier in a streptozotocin-induced diabetic model [Text] / K. Muranaka, Y. Yanagi, Y. Tamaki // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2006. – Vol. 47. – P. 4547–4552.

146. Namipashaki, A. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies [Text] / A. Namipashaki, Z. Razaghi-Moghadam, N. Ansari-Pour // *Cell*. – 2015. – Vol. 17 (2). – P. 187–192.

147. Navale, A.M. Role of inflammation in development of diabetic complications and commonly used inflammatory markers with respect to diabetic complications [Text] / A.M. Navale, A.N. Paranjape // *International Journal of Pharmaceutical Research*. – 2013. – Vol. 5. – P. 1–5.

148. Neurodegeneration: an early event of diabetic retinopathy [Text] / V. Marta [et al.] // *World Journal of Diabetes*. – 2010. – Vol. 1. – № 2. – P. 57–64.

149. Nitric oxide synthase 3 (NOS3) 4b/a, T-786C and G894T polymorphisms in association with diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis [Text] / S. Zhao [et al.] // *Ophthalmic Genetics*. – 2012. – Vol. 33 (4). – P. 200–207.

150. Noda, K. Role of chronic inflammation in diabetic retinopathy [Text] / K. Noda, S. Ishida // *Inflammation and Regeneration*. – 2013. – Vol. 33. – № 5. – P. 230–237.

151. Obrosova, I.G. Aldose reductase / polyol inhibitors for diabetic retinopathy [Text] / I.G. Obrosova, F. Kador, Peter // *Current Pharmaceutical Biotechnol.* – 2011. – Vol. 12. – № 3. – P. 373–385

152. Obrosova, I.G. Early diabetes-induced biochemical changes in the retina: comparison of rat and mouse models [Text] / I.G. Obrosova, V.R. Drel, A.K. Kumagai // *Diabetologia*. – 2006. – Vol. 49. – P. 13–17.

153. Obrosova, I.G. Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst [Text] / I.G. Obrosova, J.G. Mabley, Z. Zsengeller // *FASEB Journal*. – 2005. – Vol. 19. – P. 401–404.

154. Ocular neovascularization [Text] / P. Campochiaro [et al.] // *Angiogenesis: An integrative approach from science to medicine*. – 2008. – Vol. 91. – № 3. – P. 517–531.

155. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina [Text] / Y. Du [et al.] // *Proceedings National Acad. Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – № 41. – P. 16586–16591.

156. Placental growth factor contributes to micro-vascular abnormalization and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy [Text] / L. Kowalczyk [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6 (3). – P. e17462.

157. Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy [Text] / N. Miyamoto [et al.] // *Diabetologia*. – 2007. – Vol. 2 (50). – P. 461–470.

158. Predicting development of proliferative diabetic retinopathy [Text] / K.H. Nwanyanwu [et al.] // *Diabetes Care*. – 2013. – Vol. 36. – P. 1562–1568.

159. Reddy, G.B. Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy [Text] / G.B. Reddy, A. Satyanarayana, N. Balakrishna // *Molecular Vision*. – 2008. – Vol. 14. – P. 593–601.

160. Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin [Text] / H. Noma [et al.] // *Archives of Ophthalmology*. – 2002 Aug. – Vol. 120 (8). – P. 1075–1080.

161. Relationship of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms with diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes [Text] / K.G. Santos [et al.] // *Ophthalmic Genetics*. – 2012. – Vol. 33 (1). – P. 23–27.

162. Relationship of macular microcirculation and retinal thickness with visual acuity in diabetic macular edema [Text] / K. Sakata [et al.] // *Ophthalmology*. – 2007. – Vol. 114. – № 11. – P. 2061–2069.

163. Santos, J.M. compensatory mechanism protects retinal mitochondria from initial insult in diabetic retinopathy [Text] / J.M. Santos , S. Tewari, R.A. Kowluru // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – Vol. 53. – № 9. – P. 1729–1737.

164. Schaffer, S.W. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: unifying hypothesis of diabetes revisited [Text] / S.W. Schaffer, C.J Jong, M. Mozaffari // *Vascular Pharmacology*. – 2012. – Vol. 57. – № 5. – P. 139–149.

165. Schwartz, S.G. Genetics and diabetic retinopathy [Text] / S.G. Schwartz, M.A. Brantley, H.W. Flynn // *Current Diabetes Reviews*. – 2013. – Vol. 9. – № 1. – P. 86–92.

166. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis [Text] / M. Shibuya // *BMB Reports*. – 2008. – Vol. 41. – № 4. – P. 278–286.

167. Simó, R. Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy [Text] / R. Simó, J.M. Sundstrom, D.A. Antonetti // *Diabetes Care*. – 2014. – Vol. 37. – № 4. – P. 893–899.

168. Singh, A. Pathophysiology of diabetic macular edema [Text] / A. Singh, J.M. Stewart // *Clinical Ophthalmology*. – 2009. – Vol. 49. – № 2. – P. 1–11.

169. Stadler, K. Oxidative stress in diabetes [Text] / K. Stadler // *Diabetes*. – New York : Springer, 2013. – P. 272–287.

170. Stewart, M.W. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and pre-clinical characteristics of ophthalmic drugs that bind VEGF [Text] / M.W. Stewart // Expert Review of Clinical Pharmacology. – 2014. – Vol. 7. – № 2. – P. 167–180.

171. Stitt, A.W. Impaired retinal angiogenesis in diabetes [Text] / A.W. Stitt, C. McGoldrick, A. Rice-McCaldin // Diabetes. – 2005. – Vol. 54. – P. 785–794.

172. Sun, W. A selective aldose reductase inhibitor of a new structural class prevents or reverses early retinal abnormalities in experimental diabetic retinopathy [Text] / W. Sun, P.J. Oates, J.B. Coutcher // Diabetes. – 2006. – Vol. 55. – P. 2757–2762.

173. Takahashi, H. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions [Text] / H. Takahashi, M. Shibuya // Clinical Science. – 2005. – Vol. 109. – № 3. – P. 227–241.

174. Tang, W. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus [Text] / W. Tang, K.A. Martin, J. Hwa // Frontiers in pharmacology. – 2012. – Vol. 3. – P. 87.

175. The ADRB3 Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44 833 individuals [Text] / N. Kurokawa [et al.] // International Journal of Obesity. – 2008. – Vol. 32. – P. 1240–1249.

176. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy [Text] / H.-Z. Pan [et al.] // British Journal of Ophthalmology. – 2008. – Vol. 92. – P. 548–551.

177. The effect of intensive insulin treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus [Text] / D.M. Nathan [et al.]; Diabetes Control and Complications Trial Research Group // The New England Journal of Medicine. – 1993. – Vol. 329. – P. 977–986.

178. The effects of medical management on the progression of diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) eye study [Text] / E.Y. Chew [et al.] // Ophthalmology. – 2014. – Vol. 121. – P. 2443–2451.

179. The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of

Type I. Diabetic Patients [Text] / M.A. Babizhayev [et al.] // Cell Biochemistry and Biophysics. – 2015. – Vol. 71. – № 3. – P. 1425–1443.

180. Uhlmann, K. Genetics of diabetic retinopathy [Text] / K. Uhlmann, P. Kovacs, Y. Boettcher // Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. – 2006. – Vol. 114. – № 6. – P. 275–294.

181. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [Text] / K. Miyamoto [et al.] // American Journal of Pathology. – 2000. – Vol. 156. – P. 1733–1739.

182. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress [Text] / R.B. Caldwell [et al.] // Current Drug Targets. – 2005. – Vol. 6. – № 4. – P. 511–524.

183. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor like tyrosine kinase 1 (fl t-1) and a soluble variant of fl t.1 in human vascular endothelial cells [Text] / B. Barleon [et al.] // Cancer Research. – 1997. – Vol. 57. – P. 5421–5425.

184. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization [Text] / N. Kwak [et al.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2000. – Vol. 41. – № 10. – P. 3158–3164.

185. VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina [Text] / S. Ishida [et al.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2003. – Vol. 44. – № 5. – P. 2155–2162.

186. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats [Text] / Y. Li [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2008. – Vol. 3 (118). – P. 913–923.

187. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema [Text] / H. Funatsu [et al.] // Ophthalmology. – 2006. – Vol. 2 (113). – P. 294–301.

188. Wang, S. Novel targets against retinal angiogenesis in diabetic retinopathy [Text] / S. Wang, J.K. Park, E.J. Duh // Current diabetes reports. – 2012. – Vol. 12. – № 4. – P. 355–363.

189. Weerasekera, L.Y. Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy [Text] / L.Y. Weerasekera, L.A. Balmer,

R. Ram // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2015. – Vol. 56. – № 6. – P. 3721–3730.

190. Yadav, U.C.S. Prevention of VEGF-induced growth and tube formation in human retinal endothelial cells by aldose Reductase Inhibition [Text] / U.C.S. Yadav, S.K. Srivastava, K.V. Ramana // Journal of Diabetes and its Complications. – 2012. – Vol. 26. – № 5. – P. 369–377.

191. Zehetner, C. Plasma levels of vascular endothelial growth factor before and after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in patients with age-related macular degeneration, and in patients with diabetic macular oedema [Text] / C. Zehetner // British Journal of Ophthalmology. – 2013. – Vol. 97. – № 4. – P. 454–459.