

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (MMP2, MMP3, MMP9) И ГЕНА НЕОАНГИОГЕНЕЗА (VEGF) ПРИ МИКРОАНГИОПАТИЯХ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

**Шевченко А.В.¹, Прокофьев В.Ф.¹, Коненков В.И.¹, Климонтов В.В.¹,
Тян Н.В.¹, Черных Д.В.², Трунов А.Н.², Черных В.В.²**

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

² ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью исследования являлся анализ ассоциированности полиморфизма генов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *VEGF* с развитием непролиферативной диабетической ретинопатии (ДР) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2).

В исследование включен 201 пациент с СД2. Среди них 90 человек с ДР и 111 человек без признаков ДР. Исследовали полиморфизм генов *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*) и *VEGF* (*rs699947* и *rs3025039*). Генотипирование осуществляли методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и методом TaqMan-зондов.

При анализе комплексных генотипов пяти полиморфных позиций выявлена определенная закономерность в позитивно и негативно объединенных комплексах. Показано увеличение частоты *CC* генотипа в полиморфной позиции *-1306* гена *MMP2* в группе пациентов с «ранним» развитием осложнения и повышение у пациентов с наличием ДР комбинации высокого уровня *HbA1c* генотипами *MMP2-1306CC* и *MMP9-1562CT*. Компьютерное моделирование с визуальной реконструкцией сетевых взаимодействий генотипов, вовлеченных в регуляцию деструкции и ангиогенеза, и уровней *HbA1c*-продукции – интегрального показателя гликемии – выявило наличие различий в структурно-функциональной организации ген-генных и ген-белковых взаимодействий в группах больных с наличием и отсутствием ДР.

Построение интерактивных биологических сетей транскрипционной регуляции и метаболических путей и их топологический анализ позволяют строить и изучать генные и белковые взаимодействия

Адрес для переписки:

Шевченко Алла Владимировна
Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр Институт
цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
Тел.: 8 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Address for correspondence:

Shevchenko Alla V.
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology,
Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian
Branch of Russian Academy of Sciences
630060, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2.
Phone: 7 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, В.И. Коненков,
В.В. Климонтов, Н.В. Тянь, Д.В. Черных, А.Н. Трунов,
В.В. Черных «Полиморфизм генов внеклеточных
протеиназ ремоделирования соединительной ткани
(*MMP2*, *MMP3*, *MMP9*) и гена неоангиогенеза (*VEGF*)
при микроангиопатиях сетчатки глаза у пациентов
с сахарным диабетом 2 типа» // Медицинская
иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 441-450.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-441-450

© Шевченко А.В. и соавт., 2019

For citation:

A.V. Shevchenko, V.F. Prokofiev, V.I. Konenkov,
V.V. Klimontov, N.V. Tyan, D.V. Chernykh, A.N. Trunov,
V.V. Chernykh “Polymorphisms of extracellular connective
tissue remodeling proteinases and *MMP2*, *MMP3*,
MMP9 genes, and neoangiogenesis *VEGF* gene in retinal
microangiopathy in the patients with type 2 diabetes mellitus”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2019, Vol. 21, no. 3, pp. 441-450.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-441-450

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-441-450

применительно к исследованию патогенеза осложнений СД 2 типа для разработки в последующем подходов к персонафицированной профилактике и терапии.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, гены матриксных металлопротеиназ, ген фактора роста эндотелия сосудов, генные сети, математическое моделирование

POLYMORPHISMS OF EXTRACELLULAR CONNECTIVE TISSUE REMODELING PROTEINASES AND MMP2, MMP3, MMP9 GENES, AND NEOANGIGENESIS VEGF GENE IN RETINAL MICROANGIOPATHY IN THE PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Shevchenko A.V.^a, Prokofiev V.F.^a, Konenkov V.I.^a, Klimontov V.V.^a, Tyan N.V.^a, Chernykh D.V.^b, Trunov A.N.^b, Chernykh V.V.^b

^a *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

^b *Novosibirsk Branch of the S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye microsurgery", Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. The aim of our study was to perform an association analysis between *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *VEGF* gene polymorphisms and development of non-proliferative diabetic retinopathy (DR) in the type 2 diabetic patients (DM).

201 DM patients: 90 cases of DR and 111 subjects without DR features were included into the study. Polymorphic variants of *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*), and *VEGF* (*rs699947* and *rs3025039*) genes were assayed. The genetic typing was carried out by restriction fragment length polymorphism and TaqMan methods.

The analysis of complex genotypes at the five polymorphic positions has revealed some significant findings in positive and negatively incorporated complexes. Increased frequencies of *MMP2-1306 CC* genotype in the group of patients with "early" development of complication, and more frequent combination of high-level HbA1c with *MMP2-1306CC* and *MMP9-1562CT* genotypes were shown in DR patients. Computer-assisted modelling with visual reconstruction of network interactions between the genotypes involved into the destruction events and angiogenesis, as well as altered HbA1c levels (an integral parameter of glycemia), has revealed some differences in structural and functional organization of gene-gene and gene-protein interactions between the groups of patients with DR *versus* those without this disorder. Conclusion. A design of interactome biological networks based on transcription regulation and metabolic pathways, as well as their topological analysis allows to build and study interactions of genes and proteins, with reference to pathogenetic studies of DM2 complications aiming for development of approaches to personalized prevention and therapy in future times.

Keywords: diabetic retinopathy, matrix metalloproteinases genes, vascular endothelial growth factor gene, genic networks, mathematical modelling

Введение

Диабетическая ретинопатия (ДР) — одно из наиболее частых и социально значимых осложнений сахарного диабета (СД), непосредственно связанное с продолжительностью заболевания [2]. Основу патогенеза ДР составляют генетические, метаболические, гемодинамические, биохимические, иммунологические факторы, способствующие в том числе и патологическому ангиогенезу [14, 32]. Механизмы

реализации патогенного эффекта гипергликемии на сетчатку глаза остаются предметом интенсивного изучения. Показано, что при СД в сетчатке глаза активируется продукция матриксных металлопротеиназ (ММР), осуществляющих катаболизм компонентов внеклеточного матрикса и играющих важную роль в межклеточных взаимодействиях [14, 18]. У пациентов с ДР выявлено повышение уровня ММР-9 и ММР-2 в сетчатке и в стекловидном теле, увеличение активно-

сти MMP-9, MMP-3 и MMP-2 в эпиретинальных мембранах у пациентов с пролиферативной ДР [18, 21, 24]. Предполагают, что участие MMP в развитии ДР связано с увеличением проницаемости гематоретинального барьера и активацией ангиогенеза. Показано, что у больных с пролиферативной ДР ферменты семейства MMP (MMP-2 и MMP-9) включаются в патологический ангиогенез, деградируя базальную мембрану капилляров, стимулируя вращение вновь образованных сосудов в стекловидное тело, что вызывает рецидивирующие кровоизлияния и разрастание глиальной ткани [6, 14, 20]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – важный ангиогенный фактор, участвующий в патогенезе ДР. В ряде клинических исследований выявлена связь ДР с уровнем VEGF во влаге передней камеры и в стекловидном теле. Кроме того, есть данные о корреляции уровня MMP и VEGF при ДР [8, 10]. Индивидуальные особенности продукции VEGF и MMP в нормальных и патологических условиях в значительной степени детерминированы генетически. В регуляторных регионах генов *VEGF*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* выявлены полиморфные локусы, ассоциированные с изменением уровня их экспрессии [4, 17]. В ряде исследований показана ассоциированность полиморфизма регуляторных регионов генов с развитием и течением ДР, однако данные неоднозначны в разных популяционных группах [5, 13, 29], причем в России подобные исследования единичны.

Целью данного исследования был анализ ассоциированности полиморфизма в регуляторных регионах генов *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*), *VEGF* (*rs699947* и *rs3025039*) с развитием непролиферативной ДР у пациентов с СД 2 типа.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование включен 201 пациент с СД 2 типа, в том числе 156 женщин и 45 мужчин европеоидного происхождения в возрасте 43-70 лет, считающих себя и своих родителей русскими. Критериями исключения являлись: наличие клинических или лабораторных признаков СД 1 типа; признаки других специфических типов СД; острые и обострения хронических воспалительных заболеваний органа зрения; первичная открытоугольная глаукома; увеит; лечение локальными или системными ингибиторами ангиогенеза в течение трех месяцев перед исследованием.

Диагноз ДР выставлялся специалистами Новосибирского филиала ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ им. акад. С.Н. Федорова» на основании обследования, включавшего: визометрию,

определение границ поля зрения и наличие скотом, бинокулярную офтальмоскопию с использованием налобного офтальмоскопа Heine Omega 200 и линзы 20 дптр, щелевой лампы Karl Zeiss SL 115 Classic и линзы Ocular Max Field 78 дптр, двухмерное ультразвуковое сканирование на установке Tomey UD 1000. По результатам обследования пациенты разделены на 2 группы: без признаков ДР (111 человек) и с ДР (90 человек). Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. N 323 ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и одобрено комитетами по биомедицинской этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» и Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ им. акад. С.Н. Федорова». У всех пациентов было получено информированное согласие на забор биологического материала, а также использование данных исследования в научных целях.

Генотипирование

Исследовали полиморфизм регуляторных регионов генов *MMP2* (*rs2438650*), *MMP3* (*rs3025058*), *MMP9* (*rs3918242*) и *VEGF* (*rs699947* и *rs3025039*). Генотипирование *rs3025058*, *rs3918242* и *rs699947* осуществляли методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Полиморфный участок промоторного региона гена амплифицировали с использованием пары специфичных праймеров [3, 19, 26], затем продукты амплификации подвергли гидролизу соответствующей эндонуклеазой рестрикции («СибЭнзим», г. Новосибирск). Электрофорез проводили в 2,5% агарозном геле. Полиморфные позиции *rs2438650* и *rs3025039* анализировали с помощью Real-Time ПЦР с использованием коммерческих тест-систем методом TaqMan-зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология) согласно инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка

Межгрупповые различия клинических параметров сравниваемых групп пациентов оценивали с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Частоту встречаемости отдельных генотипов и комплексов определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип/комплекс генотипов, к общему числу обследованных в группе. Достоверность различий ча-

стот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц. Математическую обработку связи генетических признаков с количественными лабораторными показателями проводили в соответствии с методическими и аналитическими подходами квартильного анализа. В качестве параметров повышенной концентрации показателей принимаются диапазоны выше р75, а сниженной – ниже р25. Визуализацию попарных ген-генных и ген-белковых (HbA1c) взаимодействий в группах с наличием и отсутствием ДР в виде интерактивной биологической сети осуществляли в программе Cytoscape v. 3.6.0 [23]. Интерпретация результатов визуализации осуществлялась на основе общих глобальных и локальных топологических свойств биологических сетей [7]. Статистическая обработка проводилась с помощью специализированных пакетов прикладных программ StatSoft Statistica 10.0, IBM SPSS Statistics 23 и пакета оригинальных программ объемной обработки биоинформации, включая многокомпонентный генетический анализ, на основе методов комбинаторики в теории вероятности. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

Выделенные группы не различались между собой по возрасту, индексу массы тела (ИМТ), холестерина липопротеидов низкой и высокой плотности (ЛПНП и ЛПВП), общего холестерина и триглицеридов. Длительность СД ($11,7 \pm 6,7$ лет против $15,3 \pm 6,9$ лет, $p = 0,0002$) и уровень HbA_{1c} ($8,2 \pm 1,9\%$ против $9,1 \pm 1,7\%$, $p = 0,0004$) ожидаемо оказались больше у пациентов с ДР. Частоты генотипов анализируемых полиморфных позиций генов *MMP3*, *MMP9* и *VEGF +936* в группах больных СД 2 типа с наличием и отсутствием ДР находились в равновесии Харди–Вайнберга. Наблюдалось отклонение от распределения Харди–Вайнберга в сторону уменьшения гетерозиготности *MMP2 -1306* у пациентов двух групп ($\chi^2 = 6,84$, $p = 0,009$ у пациентов с ДР и $\chi^2 = 8,65$, $p = 0,003$ у пациентов без ДР) и *VEGF -2578* у пациентов с СД2 и наличием ДР ($\chi^2 = 6,36$, $P = 0,01$), что может быть обусловлено тем, что обе группы представлены пациентами, страдающими СД 2 типа. Нами не выявлено достоверных различий при анализе частот отдельных генотипов *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* и *VEGF +936* в группах больных с наличием и отсутствием ДР. Частота гетерозиготного варианта гена *VEGF -2578* снижена у пациентов с развитием сосудистого осложне-

ния ($OR = 0,46$, $OR\ 95\%C\ 0,26-0,81$, $\chi^2 = 6,59$, $P = 0,0102$). При анализе комплексных генотипов пяти полиморфных позиций выявлен ряд как позитивно, так и негативно ассоциированных с патологией комплексов (табл. 1). Различия частот комплексных генотипов, объединяющих полиморфные позиции генов *MMP* и *VEGF* обладают достаточно высокой степенью достоверности и величиной относительного риска развития ДР. Кроме того, наблюдается определенная закономерность в позитивно и негативно объединенных комплексах. Так, например, позиция *VEGF +936* в негативных комплексах представлена *CC* генотипом, в то время как в позитивно ассоциированных с ДР комплексах в этой позиции только *CT* генотип. Другая позиция данного гена представлена только гетерозиготным вариантом в комплексах, являющихся протективными для развития ДР.

Учитывая, что на развитие ДР значительное влияние оказывает длительность СД и уровень гликемии, мы проанализировали особенности полиморфизма изучаемых генов с учетом этих клинических факторов с использованием дизайна «случай–контроль». При сравнении подгрупп пациентов с длительностью заболевания менее 15 лет и наличием ДР относительно пациентов с длительным (более 15 лет) СД и отсутствием признаков ДР выявлено увеличение частоты *CC* генотипа в полиморфной позиции *-1306* гена *MMP2* в группе пациентов с «ранним» развитием осложнения ($OR = 2,7$, $p = 0,04$, табл. 2).

При анализе частот генотипов с учетом уровня HbA_{1c} у пациентов двух групп был применен квартильный подход. Анализ выявил достоверное повышение у пациентов с наличием ДР комбинации высокого уровня HbA_{1c} генотипами *MMP2 -1306CC* и *MMP9 -1562CT* ($OR = 2,4$, $p = 0,03$ и $OR = 4,49$, $p = 0,02$ соответственно). Частота сочетаний невысокого уровня HbA_{1c} (LL) с генотипами *MMP2 -1306CC*, *MMP3 -11715A5A*, *MMP3 -11715A6A*, *MMP9 -1562CC*, *VEGF -2578 CA*, *VEGF +936 CC* у пациентов с наличием ДР оказалась достоверно ниже, чем в группе без ДР ($OR = 0,1$; $OR = 0,18$; $OR = 0,15$; $OR = 0,24$; $OR = 0,10$; $OR = 0,21$ соответственно) (табл. 3).

Нами проведено исследование попарных ген-генных и ген-белковых (HbA_{1c}) взаимодействий в группах больных с наличием предрасположенности и устойчивости к развитию ДР. Выполнена визуализация этих взаимодействий в виде биологических сетей и изучена особенность их топологии с помощью программы Cytoscape (рис. 1 и 2). Как видно из рисунка 1, характерной особенностью структурно-функциональной организации генно-белковой сети, ассоциированной с устойчивостью к развитию ДР, является ее способность

ТАБЛИЦА 1. АНАЛИЗ РАЗЛИЧИЙ ЧАСТОТ КОМПЛЕКСНЫХ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ MMP2, MMP3 И MMP9, VEGF В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ СД 2 ТИПА С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ ДР

TABLE 1. ANALYSIS OF FREQUENCIES DISTINCTIONS OF COMPLEX GENOTYPES OF MMP2, MMP3 AND MMP9, VEGF GENES IN GROUPS OF DM PATIENTS WITH AND WITHOUT DR

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с ДР Patients with DR N = 90 (%)	Пациенты без ДР Patients without DR N = 111 (%)	OR	OR_CI95	P_tmF ₂
VEGF-2578:VEGF+936	CA-CC	19 (21,1)	45 (40,5)	0,39	0,21-0,74	0,0038
VEGF-2578:MMP3-1171	CA-55	5 (5,6)	17 (15,3)	0,33	0,12-0,92	0,0392
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306	CA-CC-CC	8 (8,9)	24 (21,6)	0,36	0,15-0,84	0,0193
VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171	CA-CC-56	9 (10,0)	28 (25,2)	0,33	0,15-0,74	0,0060
VEGF-2578:VEGF+936:MMP9-1562	CA-CC-CC	9 (10,0)	27 (24,3)	0,35	0,15-0,78	0,0095
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171	CA-CC-CC-56	4 (4,5)	17 (15,3)	0,26	0,08-0,80	0,0186
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	CA-CC-CC-CC	4 (4,5)	16 (14,4)	0,28	0,09-0,87	0,0307
VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	CA-CC-56-CC	5 (5,6)	19 (17,1)	0,28	0,10-0,80	0,0152
VEGF-2578:MMP3-1171	AA-56	16 (17,8)	8 (7,2)	2,78	1,13-6,85	0,0282
MMP2-1306:MMP3-1171:MMP9-1562	CC-66-CT	6 (6,7)	0	17,36	0,96-312,49	0,0071
VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	CT-CC-CC	19 (21,3)	8 (7,2)	3,49	1,45-8,43	0,0060
VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	CT-56-CC	16 (17,8)	8 (7,2)	2,78	1,13-6,85	0,0282
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	CA-CT-CC-CC	9 (10,1)	2 (1,8)	6,13	1,29-29,15	0,0128
VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171:MMP9-1562	CT-CC-56-CC	12 (13,5)	4 (3,6)	4,17	1,30-13,42	0,0162

Примечание. OR – отношение шансов; OR_CI95 – 95%-й доверительный интервал; P_tmF₂ – двусторонний точный метод Фишера.

Note. OR, odds ratio; OR_CI95, 95% confidence interval; P_tmF₂, bilateral Fisher's exact test.

к саморегуляции уровней промоторной активности генов регуляторов ангиогенеза (VEGF, MMP) и HbA1c-продукции за счет замкнутых регуляторных контуров с отрицательными и положительными обратными связями, представленных двумя закрытыми триплетами с общим хабом в виде белкой вершины HbA1c-LL (нижний квартиль гликированного гемоглобина). Такая топология генно-регуляторной сети обеспечивает сбалансированное протекание процессов ангиогенеза и функционирования внеклеточного матрикса в сетчатке глаза, что препятствует развитию ДР у больных СД2. Тогда как для топологии интерактивной сети Hb-MMP-VEGF, свойственной больным с ДР (рис. 2), характерен низкий уровень кластеризации за счет присутствия только двух открытых триплетов без общего белкового (HbA1c-НН) хаба. Такая структурно-функциональная организация генно-регуляторной сети

не способна, с одной стороны, обеспечить взаимную саморегуляцию промоторной активности генов регуляторов ангиогенеза и ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса, а с другой стороны – создать активный регуляторный контур для обеспечения оптимального уровня продукции гликированного гемоглобина. Представленные на данном рисунке 2 паттерны генов и ген-белковые взаимодействия, на наш взгляд, могут определять предрасположенность к развитию ДР, влияя на интенсивность процессов иммунного воспаления и активацию аномального неоангиогенеза в сетчатке.

Обсуждение

Несмотря на доказанную значимость клинических признаков как факторов риска ДР, даже в совокупности они не объясняют полностью риск развития данного осложнения. Наиболее

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ РАЗЛИЧИЙ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ MMP2, MMP3 И MMP9, VEGF В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ С РАЗВИТИЕМ ДР ПРИ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СД МЕНЕЕ 15 ЛЕТ И ОТСУТСТВИЕМ ДР ПРИ ДЛИТЕЛЬНОСТИ СД БОЛЕЕ 15 ЛЕТ

TABLE 2. ANALYSIS OF FREQUENCIES DISTINCTIONS OF GENOTYPES MMP2, MMP3 AND MMP9, VEGF GENES IN PATIENTS WITH DR DURATION DM LESS THAN 15 YEARS AND WITHOUT DR AT DURATION DM MORE THAN 15 YEARS

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с ДР СД < 15 лет Patients with DR DM < 15 years N = 45 (%)	Пациенты без ДР СД > 15 лет Patients without DR DM > 15 years N = 45 (%)	OR	OR 95%CI	P
MMP2 -1306	CC	32 (71,1)	21 (47,7)	2,70*	1,03-7,13	0,0422
	TC	8 (17,8)	17 (38,7)	0,34	0,11-1,00	0,0507
	TT	5 (11,1)	6 (13,6)	0,79	0,22-2,81	0,9682
MMP3 -1171	5A5A	8 (17,8)	8 (17,8)	1,00	0,30-3,34	0,7827
	5A6A	29 (64,4)	22 (48,9)	1,89	0,75-4,83	0,2018
	6A6A	8 (17,8)	15 (33,3)	0,43	0,14-1,28	0,1470
MMP9 -1562	CC	30 (66,7)	32 (71,1)	0,81	0,30-2,18	0,8198
	CT	15 (33,3)	12 (26,7)	1,38	0,51-3,75	0,6454
	TT	0	1 (2,2)	ns		
VEGF -2578	AA	12 (26,7)	15 (33,3)	0,73	0,29-1,80	0,6454
	AC	18 (40,00)	15 (33,3)	1,33	0,56-3,15	0,6617
	CC	15 (33,3)	15 (33,4)	1,00	0,42-2,40	0,8231
VEGF +936	CC	24 (53,3)	32 (71,1)	0,46	0,19-1,11	0,1280
	CT	20 (44,5)	13 (28,9)	1,97	0,82-4,71	0,1893
	TT	1 (2,2)	0	ns		

Примечание. * – χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность = 4,13; p = 0,0422.

Note. *, Chi-square test with Yates correct = 4.13, p = 0.0422.

ТАБЛИЦА 3. СОВМЕСТНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ HbA1c И ГЕНОТИПОВ MMP И VEGF У ПАЦИЕНТОВ С СД2 И ДР ОТНОСИТЕЛЬНО ПАЦИЕНТОВ С СД2, НО БЕЗ ДР

TABLE 3. THE JOINT ANALYSIS OF HbA1c LEVEL AND MMP AND VEGF GENOTYPES AT DM PATIENTS WITH DR CONCERNING DM PATIENTS WITHOUT DR

Уровень HbA1c/генотип Level HbA1c/genotype	Пациенты с СД2 и ДР Patients with DM and DR N = 85	Пациенты с СД2 без ДР Patients with DM without DR N = 104	OR	OR's 95%CI	P(tmF ₂)
LL/MMP2 -1306CC	2 (2,4)	20 (19,2)	0,10	0,02-0,45	0,0004
LL/MMP3 -11715A6A	3 (3,543)	20 (19,2)	0,15	0,04-0,54	0,0013
LL/MMP3 -11715A5A	2 (2,4)	12 (11,5)	0,18	0,04-0,85	0,0230
LL/MMP9 -1562CC	7 (8,2)	28 (26,9)	0,24	0,10-0,59	0,0012
LL/VEGF -2578 CA	2 (2,4)	20 (19,2)	0,10	0,02-0,45	0,0002
LL/VEGF +936 CC	7 (8,2)	31 (29,8)	0,21	0,09-0,51	0,0002
HH/MMP2 -1306CC	20 (23,8)	12 (11,5)	2,40	1,09-5,25	0,0320
HH/MMP9 -1562CT	10 (11,8)	3 (2,9)	4,49	1,19-16,88	0,0207

Примечание. Высокий (HH) уровень гликированного Hb у больных СД2 (HbA1c > 9,79%); низкий (LL) уровень гликированного Hb у больных СД2 (HbA1c < 7,25%); P_tmF₂ – двусторонний точный метод Фишера.

Note. High level (HH) of glycated hemoglobin at DM patients (HbA1c > 9.79%); low level (LL) of glycated hemoglobin at DM patients (HbA1c < 7.25 %); P_tmF₂, bilateral Fisher's exact test.

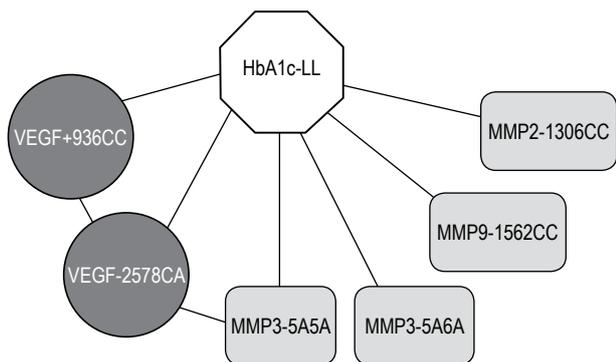


Рисунок 1. Ген-белковая сеть *Hb-MMP-VEGF* при сахарном диабете 2 типа с наличием резистентности к развитию ретинопатии

Figure 1. Gene-proteins network *Hb-MMP-VEGF* at diabetes mellitus type 2 and retinopathy resistance

значимые факторы – продолжительность СД и уровень HbA1c, по некоторым данным, объясняют приблизительно 11% риска развития ДР и ее осложнений. До 90% риска развития патологии объясняется вкладом других факторов, включая генетические [15, 25]. Гены *MMP* и *VEGF* представляют определенный интерес в качестве генов-кандидатов развития ДР, учитывая значение продуктов этих генов для регуляции проницаемости гематоретинального барьера и процесса ангиогенеза [24, 29] и доказанной ассоциированности генетического полиморфизма регуляторных регионов этих генов с уровнем их экспрессии [1, 5, 17]. Однако исследования, оценивающие ассоциированность полиморфизма этих генов с развитием диабетических микроангиопатий, достаточно не однородны. Yang и соавт., исследуя полиморфизм генов *MMP* в китайской популяции, предположили, что *MMP2-1306C* может быть связан с развитием ДР у пациентов с СД2. Однако выявленные ими различия были не велики, а частоты генотипов не различались между подгруппами с НПДР, ППДР, ПДР [30]. При анализе пяти полиморфизмов *MMP2* и двух полиморфизмов *MMP9*, включая *MMP-2 -1306C/T* и *MMP-9 -1562C/T* у кавказоидов Чехии, не показано ассоциации с ДР. При этом уровни *MMP-2* и *MMP-9* в плазме крови статистически различались между НПДР, ППДР, ПДР группами, и самый высокий уровень отмечался у пациентов с ПДР. Кроме того, высокий уровень *MMP-2* был достоверно ассоциирован с наличием генотипов *MMP2 -1306CC* и *-1306CT* [5]. При анализе распределения генотипов *MMP3 -1171 5A/6A*, выполненном в китайской популяции, не выявлено значимых различий между группами больных СД 2 с наличием и отсутствием ДР [31]. В ряде проведенных исследований, подкрепленных метаанализами, нет достовер-

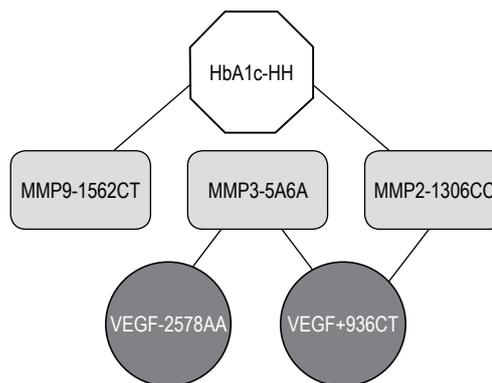


Рисунок 2. Ген-белковая сеть *Hb-MMP-VEGF* при сахарном диабете 2 типа с наличием предрасположенности к развитию ретинопатии

Figure 2. Gene-proteins network *Hb-MMP-VEGF* at diabetes mellitus type 2 and retinopathy susceptibility

ных различий частот генотипов *VEGF -2578C/A (rs699947)* в группах итальянцев и австралийцев и в азиатских группах [10, 13, 29]. Напротив, авторы другого метаанализа утверждают, что выявляются достоверные различия между группами в данной полиморфной позиции, но только для кавказоидов, но не для азиатских популяций. Наличие *VEGF -2578A* аллельного варианта гена связывают с риском развития ДР [12]. Относительно позиции *VEGF +936C/T (rs3025039)* достоверные различия выявлены только для некоторых азиатских популяций. Наличие минорного аллельного варианта в этой позиции связывают с повышенным риском развития ДР [9, 10, 13, 29]. Противоречивость результатов приведенных исследований может быть связана как с этническими различиями обследованных пациентов, так и с критериями формирования групп, влиянием негенетических факторов, прежде всего длительности СД и качества гликемического контроля на риск развития ДР. Немаловажный вклад в различия результатов разных исследований может в том числе вносить влияние других генов и полиморфных позиций анализируемого гена на развитие заболевания. Анализ возможного в нашем исследовании синергизма выявил наличие комплексов как двух позиций одного гена, так и нескольких полиморфных позиций разных генов, ассоциированных со сниженным/повышенным риском развития ДР у пациентов с СД2. Доказано, что индивидуальные генетические полиморфизмы являются слабым фактором риска развития болезни и могут быть использованы в качестве прогностической модели ее развития в очень редких случаях. Но хорошо известно, что опасным для возникновения многих заболеваний является сочетание неблагоприятных аллелей нескольких генов с аддитивным эффектом [16]. Это необходимо учитывать на этапе оценки ком-

плексного влияния продуктов полиморфных генов на развитие болезни с целью создания панели молекулярных маркеров прогнозирования, ранней диагностики и клинического течения заболеваний.

Учитывая, что длительность СД является одним из ведущих факторов риска развития ДР, мы проанализировали различия частот генотипов *MMPs* и *VEGF* в группе пациентов с ДР при длительности заболевания менее 15 лет и в группе пациентов с длительным (более 15 лет) СД, не имеющих диабетического поражения сетчатки. Используя метод «случай-контроль», мы показали, что генотип *CC* в позиции *-1306* гена *MMP2* ассоциирован с развитием ДР в первые 15 лет заболевания. Функциональный эффект полиморфизма в промоторе гена *MMP2* на уровень экспрессии фермента был описан ранее. Показано, что замена *C→T* в позиции *MMP2 -1306* приводит к более низкому уровню экспрессии за счет нарушения целостности *Sp1* сайта связывания (*CCACC box*) промоторного региона гена [22], и, к снижению уровня *MMP-2* [4]. Таким образом, можно предполагать, что более высокая продукция *MMP-2* у больных СД2 – носителей генотипа *CC* в позиции *MMP2 -1306* способствует более раннему развитию ДР.

В ряде исследований показано, что высокий уровень гликемии может модулировать экспрессию и активность *MMP*. Причем механизмы регулирования до конца не ясны, но могут затрагивать в том числе и модификацию промоторных регионов генов [27, 28, 33]. Положительные корреляции выявлены также и между уровнем глюкозы и *VEGF* у пациентов с СД и ДР [11]. Мы показали, что сочетание высокого уровня *HbA1c* с наличием генотипов, ассоциированных с более высоким уровнем экспрессии *MMP* (*MMP2 -1306CC* и *MMP9 -1562CT*) повышает риск развития ДР у пациентов с СД 2 типа. При этом значимость ассоциации уровня *HbA1c* с развитием ДР повышалась при комбинации *HbA1c* с вариантами

исследованных генов. Значение *OR* при квантильном анализе различий только уровня *HbA1c* в этих группах без учета полиморфизма не является достоверным.

Проведенное нами в данной работе компьютерное моделирование с визуальной реконструкцией сетевых взаимодействий генотипов, вовлеченных в регуляцию процессов деструкции и ангиогенеза, и уровней *HbA1c*-продукции – интегрального показателя гликемии – выявило наличие различий в структурно-функциональной организации ген-генных и ген-белковых взаимодействий в группах больных с наличием и отсутствием ДР, характеризующихся разным уровнем сбалансированности процессов иммунного воспаления, ангиогенеза и функционирования внеклеточного матрикса в сетчатке глаза. Ввиду того, что гены, полиморфизмы которых исследованы нами, кодируют структуры белков, активно влияющих на внутриклеточный метаболизм, можно предположить, что их структура отражает и геномно-метаболические взаимодействия. Эти заключения представляются тем более важными, что нами проанализированы полиморфные участки генов, связанные не со структурой их белковых продуктов, а с регуляторными участками генов, влияющих на количество продуцируемых клетками белков, обладающих способностью влиять на процессы ангиогенеза и ремоделирования соединительной ткани, являющейся основой для прорастания сосудистой и капиллярной сетей.

Таким образом, как показывают наши исследования, построение интерактивных биологических сетей транскрипционной регуляции и метаболических путей и их топологический анализ на основе биоинформационной платформы *Cytoscape* позволяют строить и изучать генные и белковые взаимодействия применительно к исследованию патогенеза осложнений СД 2 типа для разработки в последующем подходов к персонализированной профилактике и терапии.

Список литературы / References

1. Климонтов В.В., Тянь Н.В., Орлов Н.Б., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Мякина Н.Е., Булumbaева Д.М., Коненков В.И. Взаимосвязь уровня фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови и полиморфизма гена *VEGFA* с ишемической болезнью сердца у больных сахарным диабетом 2-го типа // Кардиология, 2017. Т. 57, № 5. С. 17-22. [Klimontov V.V., Tian N.V., Orlov N.B., Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Myakina N.E., Bulumbaeva D.M., Konenkov V.I. Association of serum levels and gene polymorphism of vascular endothelium growth factor with coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Kardiologiya = Cardiology*, 2017, Vol. 57, no. 5, pp. 17-22. (In Russ.)]
2. Abu El-Asrar A., Miden A., Al-Shabrawey M., Mohammad G. New developments in the pathophysiology and management of diabetic retinopathy. *J. Diabetes Res.*, 2013, Vol. 2013, 424258. doi: 10.1155/2013/424258.
3. Banyasz I., Szabo S., Bokodi G., Vannay A., Vásárhelyi B., Szabó A., Tulassay T., Rigó J. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 12, pp. 233-236.
4. Belo V., Luizon M., Carneiro P., Gomes V., Lacchini R., Lanna C., Souza-Costa D. Effect of metabolic syndrome risk factors and *MMP-2* genetic variations on circulating *MMP-2* levels in childhood obesity. *Mol. Biol. Rep.*, 2013, Vol. 40, no. 3, pp. 2697-704.

5. Beránek M., Kolar P., Tschoplova S., Kankova K., Vasku A. Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol. Vis.*, 2008, Vol. 14, pp. 1114-1121.
6. Busti C., Falcinelli E., Momi S., Gresele P. Matrix metalloproteinases and peripheral arterial disease. *Intern. Emerg. Med.*, 2009, Vol. 5, pp. 13-25.
7. Csermely P., Korcsmáros T., Kiss H.J., London G., Nussinov R. Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, 2013, Vol. 138, no. 3, pp. 333-408.
8. Di Y., Nie Q.-Z., Chen X.-L. Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor expression change in experimental retinal neovascularization. *Int. J. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 9, no. 6, pp. 804-808.
9. Fattah A., Eltanamly R., Nabih M., Kamal M. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is not associated with diabetic retinopathy in egyptian patients. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 23, no. 1, pp. 75-78.
10. Gong J., Sun Y. Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy: a meta-analysis. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 12, e84069. doi: 10.1371/journal.pone.0084069.
11. Guo L., Jiang F., Tang Y.-T., Si M.-Y., Jiao X.-Y. The association of serum vascular endothelial growth factor and ferritin in diabetic microvascular disease. *Diabetes Technol. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 224-234.
12. Guo L., Lyu H. Meta analysis of the association between vascular endothelial growth factor -2578 C/A polymorphism and risk for diabetic retinopathy. *Chin. J. Exp. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 33, no. 1, pp. 70-75.
13. Han L., Zhang L., Xing W., Zhuo R., Lin X.L., Hao Y., Wu Q., Zhao J. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies review article. *J. Diabetes Res.*, 2014, Vol. 2014, 805801. doi: 10.1155/2014/805801.
14. Kowluru R., Zhong Q., Santos J. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2012, Vol. 21, no. 6, pp. 797-805.
15. Kuo J., Wong T., Rotter J. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy. *JAMA Ophthalmol.*, 2014, Vol. 132, no. 1, pp. 96-107.
16. Lvovs D., Favorova O.O., Favorov A.V. A polygenic approach to the study of polygenic diseases. *Acta Naturae*, 2012, Vol. 4, no. 3, pp. 62-76.
17. Metzger S., Koutsimpelas D., Brieger J. Transcriptional regulation of the VEGF gene in dependence of individual genomic variations. *Cytokine*, 2015, Vol. 76, no. 2, pp. 519-526.
18. Mohammad G., Kowluru R. Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction. *Lab. Invest.*, 2010, Vol. 90, pp. 1365-1372.
19. Okamoto K., Mimura K., Murawak Y., Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J. Gastr. Hepatol.*, 2005, Vol. 20, no. 7, pp. 1102-1108.
20. Opdenakker G. Matrix metalloproteinase in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmologica*, 2015, Vol. 93, S. 255.
21. Peeters S., Engelen L., Buijs J., Chaturvedi N., Fuller J., Schalkwijk C., Stehouwer C. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2015, Vol. 14, p. 31
22. Price S., Greaves D., Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele specific transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 7549-7558.
23. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 2003, Vol. 13, no. 11, pp. 2498-2504.
24. Singh M., Tyagi S. Metalloproteinases as mediators of inflammation and the eyes: molecular genetic underpinnings governing ocular pathophysiology. *Int. J. Ophthalmol.*, 2017, Vol. 10, no. 8, pp. 1308-1318.
25. Sun J., Keenan H., Cavallerano J., Asztalos B., Schaefer E., Sell D., Strauch C., Monnier V., Doria A., Aiello L., King G. Protection from retinopathy and other complications in patients with type 1 diabetes of extreme duration: the Joslin 50-Year Medalist Study. *Diabetes Care*, 2011, Vol. 34, no. 4, pp. 968-974.
26. Takahashi M., Haro H., Wakabayashi Y., Kawa-Uchi T., Komori H., Shinomiya K. The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene. *J. Bone Joint Surg.*, 2001, Vol. 83 (B), pp. 491-495.
27. Tarallo S., Beltramo E., Berrone E., Dentelli P., Porta M. Effects of high glucose and thiamine on the balance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in vascular cells. *Acta Diabetologica*, 2010, Vol. 7, no. 2, pp. 105-111.
28. Tsai W.-C., Liang F.-C., Cheng J.-W., Lin L.-P., Chang S.-C., Chen H.-H., Pang J.-H.S. High glucose concentration up-regulates the expression of matrix metalloproteinase-9 and -13 in tendon cells. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2013, Vol. 14, p. 255.
29. Xie X.-J., Yang Y.-M., Jiang J.-K., Lu Y.-Q. Association between the vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms and diabetic retinopathy risk: a meta-analysis. *J. Diabetes*, 2017, Vol. 9, no. 8, pp. 738-753.

30. Yang J., Fan X.-H., Guan Y.Q., Li Y., Sun W., Yang X.-Z., Liu R. MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. *Int. J. Ophthalmol.*, 2010, Vol. 3, no. 2, pp. 137-140.
31. Yang J., Zhang T., Cui X., Ma Y., Wang H. Correlation of polymorphism of MMP-3 gene with the risk of type 2 diabetic retinopathy. *Ann. Eye Sci.*, 2016, Vol. 31, no. 3. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2016.09.11.
32. Yuen M., Chow W., Lam K. Diabetic retinopathy: from pathophysiology to treatment. Review Article. *HKJ Ophthalmol.*, 2016, Vol. 20, no. 3, pp. 106-108.
33. Zhong Q., Kowluru R.A. Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2013, Vol. 62, no. 7, pp. 2559-2568.

Авторы:

Шевченко А.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Прокофьев В.Ф. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Коненков В.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Климонтов В.В. — д.м.н., профессор РАН, заведующий лабораторией эндокринологии, заместитель руководителя филиала по научной работе, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Тян Н.В. — младший научный сотрудник лаборатории эндокринологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Черных Д.В. — к.м.н., врач-офтальмолог ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Трунов А.Н. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Черных В.В. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shevchenko A.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Prokofiev V.F., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Konenkov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Klimontov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Endocrinology, Deputy Director for Science, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Tyan N.V., Junior Research Associate, Laboratory of Endocrinology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh D.V., PhD (Medicine), Ophthalmologist, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye Microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation

Trunov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye Microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Novosibirsk Branch, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye Microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 31.08.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 10.10.2018

Received 31.08.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 10.10.2018