УДК 617.736 DOI: 10.15372/SSMJ20180502

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОТВЕТА НА АНТИАНГИОГЕННУЮ ТЕРАПИЮ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДИАБЕТИЧЕСКОГО МАКУЛЯРНОГО ОТЕКА

Анжелла Жановна ФУРСОВА[1,2], Надежда Викторовна ЧУБАРЬ[1], Михаил Сергеевич ТАРАСОВ[1], Мария Андреевна ВАСИЛЬЕВА[1], Сарафроз Афтондил-кизи ЭРКИНОВА[3,4] Александра Сергеевна Шадрина[3,4], Екатерина Алексеевна СОКОЛОВА[2,4], Максим Леонидович ФИЛИПЕНКО[3,4]

[1] *Государственная Новосибирская областная клиническая больница*
630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, 130

[2] *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России*
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

[3] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

[4] *Новосибирский государственный университет*
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Помимо уже установленных клинических факторов, немалое влияние на эффективность ответа на анти-VEGF терапию диабетического макулярного отека могут оказывать полиморфные локусы гена *VEGF* и его рецептора *VEGFR2*. **Целью исследования** явилось изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфных локусов генов *VEGF* и *VEGFR2*, а также функциональных и анатомических параметров с ответом на терапию ранибизумабом у пациентов с диабетическим макулярным отеком. **Материал и методы.** В исследование включены 145 пациентов (145 глаз) с диабетическим макулярным отеком, разделенные на две группы: положительный ответ (А) и отсутствие ответа на ангиогенную терапию (В). Положительным ответом (группа А) считалось наличие редукции не менее 10 % центральной толщины сетчатки (ЦТС) от базовой по данным оптической когерентной томографии. Кроме того, оценивали категорию ответа: хороший ответ (А1) – редукция ЦТС более чем на 25 % и повышение максимально коррегированной остроты зрения (МКОЗ) более чем на 5 букв таблицы ETDRS, плохой ответ (группа А2) – редукция ЦТС 10–25 % и повышение МКОЗ менее чем на 5 букв таблицы ETDRS. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов в венозной крови, генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени с помощью зондов гидролизующихся проб. **Результаты.** У 45 (33,6 %) пациентов получен хороший ответ (группа А1) на терапию, у 89 (66,4 %) – «плохой» (группа А2). В группе А1 уменьшение фовеолярной толщины сетчатки произошло в среднем на 25,61 %, повышение МКОЗ составило 0,21 ± 0,07, при этом в группе А2 повышение остроты зрения составило 0,05 при редукции толщины сетчатки на 74,1 мкм (19,5 %). С изменением ЦТС ассоциирован rs3025039 гена *VEGFA* ($p = 0,02$). Уменьшение объема макулы ассоциировано с аллелем С rs2010963 гена *VEGFA* ($p = 0,03$). Для носителей аллеля Т локуса rs3025039 гена *VEGFA*, наоборот, показано более низкое значение уменьшения объема макулы ($p = 0,03$). Пациенты с генотипом Т/Т полиморфного локуса rs3025039 гена *VEGFA* статистически значимо хуже отвечают на анти-VEGF терапию.

Ключевые слова: диффузный макулярный отек, оптическая когерентная томография, фовеолярная толщина сетчатки, ранибизумаб.

Фурсова А.Ж. *– д.м.н., зав. офтальмологическим отделением, e-mail: anzhellafursova@yandex.ru*
Чубарь Н.В. *– врач-офтальмолог, e-mail: nvchubar@mail.ru*
Тарасов М.С. *– врач-офтальмолог, e-mail: kalman87@mail.ru*
Васильева М.А. *– врач-офтальмолог, e-mail: maryansk@mail.ru*
Эркинова С.А.-к. *– лаборант-исследователь лаборатории фармакогеномики, e-mail: sarafrozerkinova@gmail.com*
Шадрина А.С. *– к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики*
Соколова Е.А. *– к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики, e-mail: sokolovaea2608@gmail.com*
Филипенко М.Л. *– к.б.н., зав. лабораторией фармакогеномики, зав. лабораторией палеогеномики, e-mail: max@niboch.nsc.ru*

Диабетический макулярный отек (ДМО) – основная причина снижения центрального зрения у пациентов с диабетической ретинопатией, и его распространенность варьирует от 0 до 3 % при первичной постановке диагноза и возрастает до 28 % при стаже заболевания более 25 лет [11]. По данным Государственного регистра больных сахарным диабетом (СД), на январь 2015 г. в РФ насчитывалось 5,57 млн страдающих им лиц. Однако истинная численность больных СД в РФ приблизительно в 3–4 раза больше официально зарегистрированной и достигает 9–10 млн человек (около 7 % населения) [1].

Патогенез ДМО сложный и многофакторный, последовательность событий, которые приводят к развитию заболевания, остается до конца не ясной. Развитие ДМО связано с нарушением гематоофтальмологического барьера на фоне гипергликемии и выхода внутриретинальной жидкости из перифовеальных аномальных капилляров или микроаневризм. Следствием этого нарушения становится гипоксия и связанное с ней усиление экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), который играет ключевую роль в неоваскуляризации и нарушает взаимодействие клеток ретинального сосудистого эндотелия, увеличивая проницаемость сосудов [10]. Эффект VEGF опосредован повышением экспрессии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) в эндотелиальных клетках; показано, что внутриглазная инъекция VEGF мышам увеличивает экспрессию ICAM-1 в сосудистой сети сетчатки [12]. Согласно исследованиям H. Funatsu и соавторов [10], концентрация VEGF в стекловидном теле у пациентов с ДМО существенно повышена не только по сравнению с выявляемой у пациентов контрольной группы, но и по сравнению с концентрацией VEGF в плазме крови пациентов с ДМО. Уровень растворимого ICAM-1 (sICAM-1) в стекловидном теле пациентов с ДМО также значительно выше, чем у больных контрольной группы. Более того, имеется прямая корреляция между содержанием VEGF и sICAM-1 в стекловидном теле пациентов с диабетом (r^2 = 0,724; p = 0,0001). Наконец, концентрация VEGF и sICAM-1 в стекловидном теле достоверно коррелирует с тяжестью диабетической ретинопатии (r^2 = 0,876, p = 0,0001 и r^2 = 0,619, p = 0,0005 соответственно) [10]. Все перечисленные данные в совокупности указывают на несомненную роль VEGF в молекулярном механизме патогенеза ДМО.

VEGF в эндотелиальных клетках связывается с двумя типами рецепторов тирозинкиназы: VEGF receptor-1 (VEGFR1, Flt-1) и KDR (kinase insert domain-containing receptor), также известный как VEGFR2. Митогенные и хемотаксические эффекты VEGF в эндотелиальных клетках опосредуются главным образом через KDR, который активируется путем аутофосфорилирования тирозиновых остатков в цитоплазматической киназной области рецептора, что приводит к активации сигнальных путей, необходимых для миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, и стимулированию ангиогенеза [16]. Суммарно, любые значимые изменения во взаимодействии VEGF/KDR могут влиять на процесс ангиогенеза.

Многочисленные рандомизированные клинические исследования показали эффективность интравитреальных инъекций ингибиторов ангиогенеза (anti-VEGF) для уменьшения толщины сетчатки, резорбции жидкости и повышения остроты зрения при ряде неоваскулярных заболеваний, в том числе при ДМО. Сегодня антиангиогенная терапия является золотым стандартом лечения [16], при этом более 90 % ретинологов используют anti-VEGF препараты в качестве первой линии терапии ДМО [18]. Однако, несмотря на строгие общепринятые протоколы терапии, в соответствии с критериями эффективности 40,1 % (99%-й доверительный интервал 27,4–52,4 %) пациентов имеют плохую чувствительность или отсутствие чувствительности к анти-VEGF терапии при стандартном режиме 3–5 загрузочных инъекций и дальнейшем режиме повторного применения по данным оптической когерентной томографии в течение 12 месяцев [7].

Понятие «устойчивый макулярный отек» («persistent») подразумевает редукцию менее 10 % центральной толщины сетчатки (ЦТС) от базовой или сохранение параметров ЦТС выше нормативных данных или более 300 мкм (по данным оптической когерентной томографии) в течение последних 12 мес. за счет персистирующей экссудации [7]. «Рецидивирующий ДМО» обозначает увеличение ЦТС по меньшей мере на 10 % от достигнутого результата или от нормативных данных за счет появления новой интра- и субретинальной жидкости после первоначальной резолюции экссудативных изменений в течение 12 месяцев. Морфологические критерии эффективности терапии в данном случае являются определяющими, поскольку связанное с ними повышение остроты зрения является значимым для пациента, но не отражает истинную картину течения заболевания. Тем не менее при анализе результатов протокола I показано, что даже при интенсивном фиксированном ежемесячном режиме лечения более 35 % пациентов не достигли улучшения максимально коррегированной остроты зрения (МКОЗ) на ≥ 10 букв и более 55 % –

на ≥ 15 букв после двух лет первой линии терапии ингибиторами ангиогенеза [9]. Причины неполного или слабого ответа на терапию сегодня широко обсуждаются рядом исследователей с целью найти основные факторы, влияющие на результат лечения для ранней идентификации тех пациентов, которым необходимо изменение выработанных алгоритмов лечения: увеличение дозы или кратности терапии, переключение на другие активные агенты, добавление хирургических методов лечения [17].

Помимо уже установленных клинических факторов – предикторов резистентности, таких как возраст пациента, суб- и интраретинальная жидкость, кисты, наличие в анамнезе патологии почек, исходные показатели ЦТС, тяжесть диабетической ретинопатии [5, 15], немалое влияние на эффективность ответа на анти-VEGF терапию могут оказывать полиморфные локусы гена *VEGF* и его рецептора *VEGFR2*. Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение ассоциации однонуклеотидных полиморфных локусов (ОНП) генов *VEGF* (rs2010963, rs3025039, rs69947) и *VEGFR2* (rs1870377), а также функциональных и анатомических параметров с ответом на терапию ранибизумабом у пациентов с диабетическим макулярным отеком.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клиническое исследование выполнено на базе офтальмологического отделения Новосибирской областной клинической больницы, генетические исследования – в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). В исследование включены 145 пациентов (145 глаз) с сахарным диабетом: I тип – 22 человека (15,9 %), II тип – 123 (84,1 %); длительность заболевания – медиана 16 лет, интерквартильный размах 13–20 лет. Возраст пациентов – медиана 63 года, интерквартильный размах 54,3–67,0 года; 34 мужчины и 104 женщины (24,6 и 75,4 % соответственно). Средний уровень гликированного гемоглобина 6,6 %, интерквартильный размах 5,9–8,0 %. Исследование выполнено согласно рекомендациям Хельсинкской декларации, одобрено этическим комитетом организации, все участники дали свое информированное согласие.

Критерий включения в исследование – наличие клинически значимого макулярного отека согласно критериям ETDRS [12], определяемого по толщине сетчатки в макулярной области в диаметре диска зрительного нерва от центра фовеа при клинической биомикроскопии. ЦТС определяли с помощью оптической когерентной томографии (Cirrus HD-OCT, Humphrey Zeiss, Германия). Макулярную область сканировали в вертикальном и горизонтальном меридиане с помощью 5-линейного растра, центрированного через фовеа в бескрасном цвете. Все пациенты имели исходный уровень гликированного гемоглобина <9 % за шесть месяцев до включения в исследование и в течение периода наблюдения. Стадия диабетической ретинопатии во всех случаях соответствовала непролиферативной. Критерии исключения из исследования – наличие пролиферативной диабетической ретинопатии, активной неоваскуляризации, сопутствующих глазных заболеваний (глаукома, увеиты и др.), патология витреомакулярного интерфейса с тракционным компонентом и витреомакулярной адгезией, лазерная коагуляция в анамнезе, предшествующая медикаментозная интравитреальная терапия, хирургические вмешательства на стекловидном теле.

Все пациенты получали минимально три загрузочных инъекции препарата ранибизумаб 0,5 мг (0,05 мл) через четыре недели по стандартной методике в условиях операционной эндовитреально после местной эпибульбарной анестезии раствором алкаина (Alcon, США) через иглу 27 G в 3 мм от лимба. Для оценки эффективности проводимой терапии изучали МКОЗ, ЦТС исходно и после трех инъекций. При наличии ДМО обоих глаз учитывался только один с более выраженными изменениями.

Все пациенты разделены на две группы: A и B, в зависимости от наличия или отсутствия ответа на антиангиогенную терапию. Положительным ответом (группа A) считалось наличие редукции не менее 10 % фовеолярной толщины сетчатки от базовой по данным оптической когерентной томографии. Кроме того, оценивали категорию ответа: хороший ответ (A1) – редукция ЦТС более чем на 25 % и повышение МКОЗ более чем на 5 букв таблицы ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study), плохой ответ (группа A2) – редукция ЦТС 10–25 % и повышение МКОЗ менее чем на 5 букв таблицы ETDRS.

Основная гипотеза нашего исследования заключалась в том, что ответ на анти-VEGF терапию ДМО может зависеть от базового уровня экспрессии *VEGF* и его рецептора (*VEGFR2*), который определяется в том числе и генотипом полиморфных локусов в данных генах. Наиболее привлекательными для нашего исследования являются локусы, для которых уже показана связь с уровнем экспрессии *VEGF* (rs2010963 [13–15], rs3025039 [2]) или функциональная значимость (*VEGFR2*, rs1870377). Функциональный ОНП (rs1870377, Q472H, локализованный в 11 экзоне) расположен в пятом N-концевом Ig-подобном до-

мене внутри внеклеточного региона рецептора. Несинонимичная аминокислотная замена приводит к снижению эффективности связывания VEGF с KDR (VEGFR2) [4]. Полиморфный локус rs699947 расположен в промоторной области гена *VEGF* в одном блоке сцепления с rs2010963 [16], фланкируя дистальный 5'-район промотора. Совместное исследование локусов rs699947, rs2010963 и rs3025039 также позволит картировать положение функционального локуса [14]. Итак, в нашем исследовании мы выбрали следующие ОНП: *VEGF* (rs2010963, rs3025039, rs69947) и *VEGFR2* (rs1870377).

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов венозной крови путем переваривания протеиназой К с последующей экстракцией фенолом и хлороформом и осаждением этанолом. Образцы ДНК хранили при –20 °С. Генотипирование проводили методом ПЦР в режиме реального времени с помощью зондов гидролизующихся проб согласно протоколу, описанному в нашей предыдущей работе [13]. Значимость различий между группами определяли с помощью U-критерия Манна – Уитни. Равновесие Харди – Вайнберга оценивали с использованием точного теста в программном приложении R project (www.rproject.org). С помощью логистического регрессионного анализа с поправкой на возраст и пол, реализованного в функции «glm» R-project, были найдены возможные связи между ОНП и исходом лечения. Результаты считали статистически значимыми для всех расчетов при $p < 0,05$. Все количественные данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (Me, [Q_1–Q_3]).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Демографические и клинические характеристики пациентов до и после лечения отражены в табл. 1. Исследовано 145 пациентов (145 глаз), при этом группа А («наличие положительного ответа») составила 134 пациента (92,4 %), группа В («отсутствие ответа») – 11 (7,6 %). В зависимости от категории ответа у 45 (33,6 %) человек получен хороший ответ (группа А1) на терапию, у 89 (66,4 %) – «плохой» (группа А2). Исходная МКОЗ была статистически значимо ($p < 0,05$) наиболее высокой в группе А1 по сравнению с группами А2 и В, что закономерно являлось следствием меньших исходных величин ЦТС (296, [247–378] мкм) и объема макулы (табл. 1).

После трех загрузочных инъекций ранибизумаба в группе А1 получен наилучший анатомический и функциональный результат – уменьшение фовеолярной толщины в среднем на 25,61 %, повышение МКОЗ составило 0,21 ± 0,07 %, при этом в группе А2 повышение остроты зрения составило 0,05 при редукции толщины сетчатки на 74,1 мкм (19,5 %). Таким образом, у 31,0 % пациентов достоверно достигнут ответ на лечение ингибиторами ангиогенеза, проявившийся нормализацией или улучшением анатомических и функциональных результатов. В группе пациентов с отсутствием ответа динамика в резорбции отека отсутствовала, а в некоторых случаях наблюдалось увеличение ЦТС (в среднем на 33,82 мкм), что сопровождалось отсутствием динамики МКОЗ, величина которой составила 0,08 ± 0,09, как и до лечения.

Таблица 1

Характеристика пациентов до и после лечения

Показатель	Ответ (n = 134 глаза)				Нет ответа (n = 11 глаз)	
	Хороший ответ (n = 45)		Плохой ответ (n = 89)			
Количество мужчин/ количество женщин, n (%)	11 (24,4 %)/34 (75,6 %)		23 (25,8 %)/66 (74,2 %)		2 (18,2 %)/9 (81,8 %)	
Возраст, лет	60 [47–66]		64 [57–68]		64 [58,5–65]	
Длительность заболевания, лет	16 [13,0–20,0]		16 [12,0–20,0]		19 [15,8–22,3]	
Содержание HbA1c, %	6,10 [5,78–8,12]		6,70 [6,03–7,75]		7,95 [6,08–8,15]	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
ФТ, мкм	296 [247–378]	240 [212–272]	358 [275–491]	290 [231–342]	444 [342,5–584,5]	485 [357–614]
Объем макулы, мм^3	11 [10,5–12,4]	9,9 [9,7–10,8]	11,7 [10,6–12,9]	10,8 [10,0–11,7]	14,5 [13,3–15,4]	13,6 [13,3–15,2]
МКОЗ	0,3 [0,1–0,4]	0,5 [0,3–0,6]	0,1 [0,08–0,30]	0,2 [0,1–0,4]	0,06 [0,01–0,17]	0,04 [0,01–0,17]

Таблица 2

Распределение генотипов

Вариант ответа	rs699947 CC/CA/AA	rs2010963 GG/GC/CC	rs3025039 CC/CT/TT	rs1870377 TT/TA/AA
Хороший ответ	8/27/10 A = 0,52	23/19/3 C = 0,28	34/11/0 T = 0,12	27/16/2 A = 0,22
Плохой ответ	23/47/19 A = 0,48	50/34/5 C = 0,25	67/19/3 T = 0,14	47/37/5 A = 0,26
Нет ответа	1/9/1 A = 0,50	9/1/1 C = 0,14	4/7/0 T = 0,32	5/5/1 A = 0,32
Всего с ДМО	32/83/30 A = 0,49	82/54/9 C = 0,25	105/37/3 T = 0,15	79/58/8 A = 0,26

Примечание. В каждой ячейке приведены генотипы и частота минорного аллеля.

Таблица 3

Связь между ответом на лечение анти-VEGF и ОНП-ами VEGFA и VEGFR2

ОНП, аллель риска	Ответ (0), нет ответа (1) ОШ [95%-й доверительный интервал], уровень значимости	Хороший ответ (0), плохой ответ (1) ОШ [95%-й доверительный интервал], уровень значимости
rs699947 (*VEGFA*), A	1,02 [0,40–2,62], $p = 0,96$	0,82 [0,47–1,43], $p = 0,48$
rs2010963 (*VEGFA*), C	0,44 [0,12–1,59], $p = 0,21$	0,89 [0,49–1,63], $p = 0,71$
rs3025039 (*VEGFA*), T	3,46 [1,15–10,46], $p = 0,03$	1,33 [0,61–2,87], $p = 0,47$
rs1870377 (*VEGFR2*), A	1,37 [0,51–3,69], $p = 0,54$	1,17 [0,62–2,23], $p = 0,62$

Генотипы полиморфных локусов rs699947, rs2010963, rs3025039 (*VEGFA*) и rs1870377 (*VEGFR2*) были определены у всех пациентов. Для всех этих ОНП распределение генотипов соответствовало равновесию Харди – Вайнберга в общей группе. Частоты аллелей, полученные в нашем исследовании (табл. 2), близки к таковым для европейской популяции, опубликованным в 1000 Genomes, а также к частотам контрольной группы пациентов России нашего предыдущего исследования [13].

Анализ ассоциаций с типом ответа на лечение проводился с использованием логистической регрессии согласно аддитивной модели. Отношения шансов (ОШ), скорректированные по полу и возрасту, рассчитывались для каждого ОНП (табл. 3). Был только один ОНП, статистически значимо ассоциированный с отсутствием ответа на анти-VEGF терапию – rs3025039 (*VEGFA*). Ни один другой из исследованных нами ОНП не был ассоциирован с отсутствием ответа или типом ответа. Однако более пожилой возраст в модели с учетом пола и возраста был статистически связан с плохой реакцией на терапию ($p = 0,02$).

Ассоциативный анализ с анатомическими и функциональными параметрами ответа на терапию был выполнен с помощью линейной регрессии. ОШ для каждого локуса было посчитано для модели, включающей генотип локуса и исходную величину анатомического или функционального параметра, с поправками на пол, возраст и исходную величину анатомического или функционального параметра. С изменением ЦТС ассоциирован только один ОНП rs3025039 (*VEGFA*): на 31,4 ± 13,0 мкм меньше снижается ЦТС на каждый аллель T, $p = 0,02$. Уменьшение объема макулы ассоциировано с rs2010963 (*VEGFA*), у носителей аллеля C после трех инъекций достигнуто большее снижение (–0,31 ± 13,5 на каждый аллель C, $p = 0,03$). Для носителей аллеля T локуса rs3025039 (*VEGFA*), наоборот, показано более низкое значение уменьшения объема макулы (на 0,56 ± 0,18 меньше на каждый аллель T, $p = 0,03$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании мы оценивали связь между ОНП генов *VEGF* и *VEGFR2* у пациентов с ДМО. Подавляющее большинство предыдущих работ анализировали ассоциацию полиморфных локусов гена *VEGF* и реакцию на анти-VEGF терапию в группе пациентов с воз-

растной макулодистрофией. Только исследование S.F. El-Shazly с соавт. было посвящено изучению одного ОНП *VEGF* с ДМО в группе ограниченного размера (66 человек) – rs2010963, или –634G/C [8]. В настоящей работе мы оценивали две категории ответа на анти-VEGF терапию: отсутствие ответа и плохой ответ. Один ОПН был связан с отсутствием реакции на терапию ДМО анти-VEGF (ранизумаб) – rs3025039 гена *VEGF*. Ранее H.H. Al-Habboubi с соавт. показали на 519 здоровых волонтерах, что уровень VEGF в сыворотке связан с rs3025039 (p = 0,038). Генотип T/T rs3025039 был связан с более низким уровнем VEGF (295,2 ± 215,4 пг/мл) по сравнению с генотипом C/C (475,9 ± 288,3 пг/мл) [2]. Проведенный нами анализ показал, что носители генотипа T/T статистически значимо реже отвечают на анти-VEGF терапию (3,46 [1,15–10,46]; p = 0,03) по сравнению с носителями наиболее распространенного генотипа C/C. Клинически это может быть объяснено тем, что носители генотипа T/T исходно имеют более низкий уровень экспрессии гена *VEGF* и, вероятно, клиническая картина ДМО, проявляющаяся в экссудации жидкости, вызвана альтернативными механизмами, не включающими путь VEGF/VEGFR2/ICAM-1. Таким образом, терапия, направленная на снижение уровня VEGF, в данном случае не будет таргетной, поэтому и ответ на нее отсутствует или выражен слабо. С типом ответа на терапию в нашем исследовании не выявлено ассоциаций ни для одного ОНП.

Ассоциация с отсутствием ответа локуса rs3025039 гена *VEGF* закономерно повторилась при анализе отдельных клинических параметров. Аллель T локуса rs3025039 ассоциирован (p = 0,017) с меньшим снижением толщины ЦТС в ответ на терапию по сравнению с генотипом CC: для CT 31,4 ± 13,0 мкм, для TT 62,8 ± 13,0 мкм. С менее выраженным изменением ЦТС ассоциирован (p = 0,04) также локус rs1870377 в гене *VEGFR2*: для TA на 31,9 ± 15,8 мкм, для AA на 63,8 ± 15,8 мкм по сравнению с TT. Данное наблюдение хорошо согласуется с ранее описанной функциональной ролью данной замены – несинонимичная аминокислотная замена Глн472Гис приводит к снижению эффективности связывания VEGF с KDR (VEGFR2) [4]. Вероятно, и в этом случае у пациентов с генотипом TA и TT локус rs1870377 в гене *VEGFR2* к клиническим проявлениям ДМО приводят механизмы, не затрагивающие молекулярные звенья VEGF/VEGFR2/ICAM-1.

Локус rs3025039 гена *VEGF* также ассоциирован с менее выраженным уменьшением объема макулы (p = 0,002). В среднем носители генотипа CT имеют снижение объема макулы на 0,56 ± 0,18 мм^3 меньше, а носители генотипа TT – на 1,12 ± 0,18 мм^3, чем носители CC. С изменением объема макулы ассоциирован также локус rs2010963 (p = 0,03), однако тренд направлен в противоположную сторону: носители редкого аллеля C имеют более выраженное уменьшение объема макулы, на 0,32 ± 0,15 мм^3 на каждый аллель. Это согласуется с результатами, описанными C.-F. Chen с соавт. [6]. Авторы провели анализ CHIP-seq данных проекта ENCODE и выявили 12 транскрипционных факторов, связывающихся с районом, содержащим rs2010963, в том числе TBP (белок, связывающий TATA box), для которого описана корреляция с уровнем экспрессии *VEGFA* в предыдущих работах [3]. Более того, *in vitro* авторы показали на клетках из трех разных тканей человека, что аллель rs2010963-C повышает экспрессию *VEGF* в 1,6–2,0 раза [6]. Все эти данные выстраиваются в логичную цепь молекулярных событий. Аллель C локуса rs2010963 посредством измененного взаимодействия с транскрипционными факторами, как минимум TBP, повышает экспрессию гена *VEGFA*, реализующуюся в большем количестве белка VEGF как в норме, так и в ответ на стимул, поэтому анти-VEGF терапия ДМО более эффективна у носителей аллеля C (генотипы GC и CC).

Противоположное действие локусов rs2010963 и rs3025039 объясняется их расположением в разных блоках сцепления [14]. Таким образом, в блоке сцепления, содержащем область гена *5′-UTR* и его начало, локализован функциональный локус, замена в котором приводит к повышенной экспрессии гена *VEGF*. Учитывая, что rs699947 не ассоциирован в нашем исследовании ни с отсутствием ответа или генотипом, ни с клиническими проявлениями, не исключено, что функциональный локус лежит в непосредственной близости к rs2010963 либо сам rs2010963 им и является. В пользу последнего утверждения говорят данные проекта ENCODE и *in vitro* эксперимент C.-F. Chen с соавт. [6]. В то же время второй блок сцепления, куда входит область гена *3′-UTR*, содержит функциональный локус, способствующий пониженной экспрессии гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммарно все выявленные нами ассоциации согласуются с уже известными данными и раскрывают молекулярный механизм ответа на анти-VEGF терапию у пациентов с различными вариантами генов *VEGF* и *VEGFR2*. Выводы по результатам нашего исследования:

1. Анти-VEGF терапия – эффективный метод лечения диабетического макулярного отека (134 пациента из 145 имели ответ на терапию).

2. Клиническая эффективность применения анти-VEGF в терапии диабетического макулярного отека помимо прочих факторов зависит от генотипа.

3. Пациенты с генотипом T/T полиморфного локуса rs3025039 (*VEGFA*) статистически значимо хуже отвечают на анти-VEGF терапию.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / ред. И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Сах. диабет. 2015. 18. (1S). 1–112.

2. *Al-Habboubi H.H., Sater M.S., Almawi A.W., Al-Khateeb G.M., Almawi W.Y*. Contribution of VEGF polymorphisms to variation in VEGF serum levels in a healthy population // Eur. Cytokine Netw. 2011. 22. 154–158.

3. *Bieche I., Vacher S., Vallerand D., Richon S., Hatem R., de Plater L., Dahmani A., Nemati F., Angevin E., Marangoni E., Roman-Roman S., Decaudin D., Dangles-Marie V*. Vasculature analysis of patient derived tumor xenografts using species-specific PCR assays: evidence of tumor endothelial cells and atypical VEGFA-VEGFR1/2 signalings // BMC Cancer. 2014. 14. 39–45.

4. *Bressler S.B., Ayala A.R., Bressler N.M., Melia M., Qin H., Ferris F.L., Flaxel C.J., Friedman S.M., Glassman A.R., Jampol L.M., Rauser M.E*. Persistent macular thickening after ranibizumab treatment for diabetic macular edema with vision impairment // JAMA Ophthalmol. 2016. 134. 278–285.

5. *Bressler S.B., Qin H., Beck R.W., Chalam K.V., Kim J.E., Melia M., Wells J.A*. Factors associated with changes in visual acuity and central subfield thickness at 1 year after treatment for diabetic macular edema with ranibizumab // Arch. Ophthalmol. 2012. 130. 1153–1161.

6. *Chen C.-F., Liou S.-W., Wu H.-H., Lin C.-H., Huang L.-S., Woung L.-C., Tsai C.Y*. Regulatory SNPs alter the gene expression of diabetic retinopathy associated secretary factors // Int. J. Med. Sci. 2016. 13. 717–723.

7. *Committee W., Aiello L.P., Beck R.W., Bressler N.M., Browning D.J., Chalam K.V., Davis M., Ferris F.L., 3rd, Glassman A.R., Maturi R.K., Stockdale C.R., Topping T.M*. Rationale for the diabetic retinopathy clinical research network treatment protocol for center-involved diabetic macular edema // Ophthalmology. 2011. 118. 5–14.

8. *El-Shazly S.F., El-Bradey M.H., Tameesh M.K*. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism prevalence in patients with diabetic macular edema and its correlation with anti-VEGF treatment outcomes // Clin. Experiment. Ophthalmol. 2013. 3. 23–29.

9. *Elman M.J., Qin H., Aiello L.P., Beck R.W., Bressler N.M., Ferris F.L., Glassman A.R., Maturi R.K., Melia M*. Intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema with prompt versus deferred laser treatment: three-year randomized trial results // Ophthalmology. 2012. 119. 2312–2318.

10. *Funatsu H., Yamashita H., Sakata K., Noma H., Mimura T., Suzuki M., Eguchi S., Hori S*. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema // Ophthalmology. 2005. 112. 806–816.

11. *Klein R., Klein B.E.K., Moss S.E., Davis M.D., DeMets D.L*. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema // Ophthalmology. 1984. 91. 1464–1474.

12. *Lu M., Perez V.L., Ma N., Miyamoto K., Peng H.B., Liao J.K., Adamis A.P*. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression *in vivo* // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999. 40. 1808–1812.

13. *Shadrina A.S., Smetanina M.A., Sokolova E.A., Shamovskaya D.V., Sevost'ianova K.S., Shevela A.I., Soldatsky E.Y., Seliverstov E.I., Demekhova M.Y., Shonov O.A., Ilyukhin E.A., Voronina E.N., Pikalov I.V., Zolotukhin I.A., Kirienko A.I., Filipenko M.L*. Allele rs2010963 C of the *VEGFA* gene is associated with the decreased risk of primary varicose veins in ethnic Russians // Phlebology. 2016. 31. 34–38.

14. *Sokolova E.A., Malkova N.A., Korobko D.S., Rozhdestvenskii A.S., Kakulya A.V., Khanokh E.V., Delov R.A., Platonov F.A., Popova T.Y., Aref'eva E.G., Zagorskaya N.N., Alifirova V.M., Titova M.A., Smagina I.V., El'chaninova S.A., Popovtseva A.V., Puzyrev V.P., Kulakova O.G., Tsareva E.Y., Favorova O.O., Shchur S.G., Lashch N.Y., Popova N.F., Popova E.V., Gusev E.I., Boyko A.N., Aulchenko Y.S., Filipenko M.L*. Association of SNPs of CD40 gene with multiple sclerosis in Russians // PLoS One. 2013. 8. e61032.

15. *Sophie R., Lu N., Campochiaro P.A*. Predictors of functional and anatomic outcomes in patients with diabetic macular edema treated with ranibizumab // Ophthalmology. 2015. 122. 1395–1401.

16. *Wang Y., Zheng Y., Zhang W., Yu H., Lou K, Zhang Y., Qin Q., Zhao B., Yang Y., Hui R*. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease // J. Am. Coll. Cardiol. 2007. 50. 760–767.

17. *Stewart M.W*. Anti-VEGF therapy for diabetic macular edema // Curr. Diab. Rep. 2014. 14. 23–29.

18. *Vailati F.B., Crispim D., Sortica D.A., Souza B.M., Brondani L.A., Canani L.H*. The C allele of –634G/C polymorphism in the *VEGFA* gene is associated with increased *VEGFA* gene expression in human retinal tissue // Investig. Opthalmol. Vis. Sci. 2012. 53. 64–71.

GENETIC CRITERIA FOR ANTI-ANGIOGENIC THERAPY FOR TREATMENT OF DIABETIC MACULAR EDEMA

Anzhella Zhanovna FURSOVA[1,2], Nadezhda Viktorovna CHUBAR[1], Mikhail Sergeevich TARASOV[1], Mariya Andreevna VASILYEVA[1], Sarafroz Aftondil-kizi ERKINOVA[3], Aleksandra Sergeevna SHADRINA[3,4], Ekaterina Alekseevna SOKOLOVA[3,4], Maksim Leonidovich FILIPENKO[3,4]

[1] *Novosibirsk State Region Hospital*
630087, Novosibirsk, Nemirovich-Danchenko str., 130

[2] *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia*
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52

[3] [1]*nstitute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS*
630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 8

[4] *Novosibirsk State University*
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

Apart from already established clinical factors, the polymorphic loci of the VEGF gene and its VEGFR2 receptor can have a significant effect on the response to anti-VEGF therapy of diabetic macular edema. The aim was to study the association of single nucleotide polymorphic loci of VEGF and VEGFR2 genes, as well as functional and anatomical parameters with response to ranibizumab therapy in patients with diabetic macular edema. **Material and methods**. The study includes 145 patients (145 eyes) with diabetic macular edema. All the patients are divided into 2 groups: a positive response (A) and no response to angiogenic therapy (B). The positive response (group A) was the presence of a reduction of at least 10 % of the foveolar thickness (FT) from the baseline according to the OST data. In addition, the response category was assessed: a good response (A1): a reduction in FT by more than 25 %, and an increase in MCHO by more than 5 letters of ETDRS and a poor response (group A2): a reduction in FT of 10–25 % and an increase in MCRI by less than 5 letters ETDRS. Genomic DNA was selected from leukocytes in venous blood, genotyping was performed by real-time PCR using probes of hydrolysing samples. **Results**. 45 (33.6 %) patients demonstrated a good response (group A1) to therapy and 89 (66.4 %) had a «bad» response (group A2). In group A1, the decrease in FT occurred on average by 25.61 %, the increase in MHC was 0.21 ± 0.07, while in group A2, the visual acuity increased by 0.05, with the thickness of the retina reduction by 74.1 μm (19, 5 %). Rs3025039 of the VEGFA gene is associated with the change in PTC ($p = 0.02$). The decrease in the volume of the macula is associated with the allele C rs2010963 of the VEGFA gene ($p = 0.03$). For the carriers of the T allele, the locus rs3025039 of the VEGFA gene, on the contrary, shows a lower value of the decrease in the volume of the macula ($p = 0.03$). The patients with the T / T genotype of the polymorphic locus rs3025039 of the VEGFA gene statistically respond to anti-VEGF therapy significantly worse.

Key words: diffuse macular edema, optical coherence tomography, foveolar thickness of retina, ranibizumab.

Fursova A.Zh. *– doctor of medical sciences, head of ophthalmology department, e-mail: anzhellafursova@yandex.ru*
Chubar N.V. *– ophthalmologist, e-mail: nvchubar@mail.ru*
Tarasov M.S. *– ophthalmologist, e-mail: kalman87@mail.ru*
Vasilyeva M.A. *– ophthalmologist, e-mail: maryansk@mail.ru*
Erkinova S.A.-k. *– laboratory technician of the pharmacogenomics laboratory, e-mail: sarafrozerkinova@gmail.com*
Shadrina A.S. *– candidate of biological sciences, junior researcher of the pharmacogenomics laboratory, e-mail: hamlet85@yandex.ru*
Sokolova E.A. *– candidate of biological sciences, junior researcher of the pharmacogenomics laboratory, e-mail: sokolovaea2608@gmail.com*
Filipenko M.L. *– candidate of biological sciences, head of the pharmacogenomics laboratory, head of paleogenomics laboratory, e-mail: max@niboch.nsc.ru*