

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И
ИННОВАЦИЙ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
АНДИЖАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИНСТИТУТ**

УДК: 616.8-009.85+616.036.12

**ДАДАБОЕВ ОМОНЖОН ТАЛИБДЖАНОВИЧ
ВАСИЛЕВСКИЙ ЭДУАРД АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ
У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

МОНОГРАФИЯ

**Андижан – 2025
«JAHONA NASHR»**

Авторы:

Дадабоев Омонжон Талибджанович - старший преподаватель кафедры общей хирургии и трансплантологии Андижанского государственного медицинского института, PhD

Василевский Эдуард Александрович - доцент кафедры общей хирургии и трансплантологии Андижанского государственного медицинского института, PhD

Рецензенты:

Хамдамов Бахтияр Зарифович - заведующий кафедрой факультетской и госпитальной хирургии, урологии Бухарского Государственного медицинского института, д.м.н., профессор

Косимов Адхам Лутфуллаевич - профессор кафедры общей хирургии и трансплантологии Андижанского государственного медицинского института, доктор медицинских наук

Клинико-лабораторные и молекулярно-генетические аспекты патогенеза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом: Монография / Дадабоев О.Т. Андижан: издательство «JAHONA NASHR», 2025

Монография рекомендована к печати Ученым Советом АГМИ, протокол № _____, от «___» _____ 2025 года

© О.Т.Дадабоев, 2025

© издательство «JAHONA NASHR», 2025

Данная монография посвящена комплексному анализу этиопатогенетических механизмов одного из наиболее тяжёлых и социально значимых осложнений сахарного диабета – синдрома диабетической стопы. Авторы рассматривают роль генетической предрасположенности в формировании хронических язвенно-некротических поражений нижних конечностей, уделяя особое внимание полиморфизмам генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), интерлейкина-6 (IL6) и фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и их взаимодействию с традиционными клинико-факторами риска: длительностью и декомпенсацией сахарного диабета, нейропатией, микро- и макроангиопатией, ожирением, сопутствующей сердечно-сосудистой патологией и перенесёнными тромботическими осложнениями. На основе обзора современной литературы, результатов собственных клинических наблюдений и молекулярно-генетического анализа выявлены ключевые предикторы перехода от ранних, субклинических проявлений поражения стоп к тяжёлым, деструктивным формам, требующим высокотравматичных хирургических вмешательств и нередко приводящих к ампутациям. Особое внимание уделено построению прогностических моделей, которые позволяют увязать генетические маркеры с клинико-лабораторными характеристиками течения синдрома диабетической стопы, а также сформулированы практические рекомендации по использованию генетического скрининга и интеграции молекулярно-генетических данных в мультидисциплинарный подход к лечению и профилактике, что способствует снижению частоты тяжёлых осложнений, ампутаций и инвалидизации пациентов и представляет интерес для хирургов, эндокринологов, флебологов, врачей общей практики, магистрантов и студентов медицинских вузов.

Ushbu monografiya qandli diabetning eng og'ir va ijtimoiy ahamiyatli asoratlaridan biri – diabetik oyoq sindromining etiopatogenetik mexanizmlarini kompleks tahlil qilishga bag'ishlangan. Mualliflar pastki ekstremitalarning surunkali yarali-nekrotik shikastlanishlari shakllanishida genetik moyillikning rolini ko'rib chiqadilar, ayniqsa tomir endoteliy o'sish omili (VEGFA), interleykin-6 (IL6) va o'sma nekrozi omili- α (TNF- α) genlarining polimorfizmlariga hamda ularning an'anaviy klinik xavf omillari – qandli diabet davomiyligi va dekompensatsiyasi, neyropatiya, mikro- va makroangiopatiya, semirish, hamroh yurak-qon tomir patologiyasi va o'tkazilgan trombotik asoratlar bilan o'zaro ta'siriga alohida e'tibor qaratiladi. Zamonaviy adabiyotlar tahlili, mualliflarning klinik kuzatuvlari va molekulyar-genetik tahlillar asosida oyoq shikastlanishining erta, subklinik ko'rinishlaridan yuqori travmatik jarrohlik aralashuvlarini talab qiladigan va ko'pincha amputatsiyaga olib keladigan og'ir, destruktiv shakllarga o'tishini belgilovchi asosiy prediktorlar aniqlangan. Genetik markerlarni diabetik oyoq sindromining kechishining klinik-laborator xususiyatlari bilan bog'lash imkonini beruvchi prognozlash modellari ishlab chiqilgan, shuningdek genetik skriningdan foydalanish va molekulyar-genetik ma'lumotlarni davolash va profilaktikaga multidisiplinar yondashuvga integratsiyalash bo'yicha amaliy tavsiyalar shakllantirilgan bo'lib, bu og'ir asoratlar, amputatsiyalar va bemorlar nogironlashuvi chastotasini kamaytirishga xizmat qiladi hamda jarrohlar, endokrinologlar, flebologlar, umumiy amaliyot shifokorlari, magistrantlar va tibbiyot oliy o'quv yurtlari talabalari uchun dolzarb ahamiyat kasb etadi.

This monograph is devoted to a comprehensive analysis of the etiopathogenetic mechanisms of one of the most severe and socially significant complications of diabetes mellitus – diabetic foot syndrome. The authors examine the role of genetic predisposition in the development of chronic ulcerative–necrotic lesions of the lower extremities, with particular attention to polymorphisms of the genes encoding vascular endothelial growth factor (VEGFA), interleukin-6 (IL6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), as well as to their interaction with traditional clinical risk factors such as the duration and decompensation of diabetes mellitus, neuropathy, micro- and macroangiopathy, obesity, concomitant cardiovascular disease and previous thrombotic complications. On the basis of a review of contemporary literature, the authors' own clinical observations and molecular genetic analyses, key predictors of progression from early, subclinical manifestations of foot damage to severe, destructive forms that require highly traumatic surgical interventions and often lead to amputation have been identified. Prognostic models have been developed that make it possible to link genetic markers with the clinical and laboratory characteristics of the course of diabetic foot syndrome, and practical recommendations have been formulated on the use of genetic screening and the integration of molecular genetic data into a multidisciplinary approach to treatment and prevention. This contributes to reducing the frequency of severe complications, amputations and disability among patients and is of interest to surgeons, endocrinologists, phlebologists, general practitioners, as well as master's students and medical students.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА I. СОВРЕМЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОЦЕНКИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.....	19
§ 1.1. СИНДРОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ КАК ЗНАЧИМАЯ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНАЯ И ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА	19
§ 1.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.....	24
§ 1.3. ВЛИЯНИЕ И РОЛЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ (IL-6, TNF - A) И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (VEGFA) В ПАТОГЕНЕЗЕ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ	33
1.3.1. Значение хронического воспаления и ассоциации полиморфных локусов генов цитокинов (IL-6 и TNF - a) в патогенезе синдрома диабетической стопы.....	34
1.3.2. Современные представления о значении нарушения процесса ангиогенеза и мутациях гена сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFA) в формирование синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.....	49
§2.1. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ГРУПП	49
§2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.	54
2.2.1. Клинико-лабораторные и инструментальные методы.....	54
2.2.2. Инструментальные методы исследования.	57
2.2.3. Генетические методы исследований.	58

2.2.4. Статистическая обработка и математические методы анализа.	64
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ	66
§3.1.1. Клинические характеристики пациентов с синдромом диабетической стопы.....	66
§ 3.1.2. Характеристика лабораторных анализов у пациентов с синдромом диабетической стопы.....	68
§ 3.1.3. Частота встречаемости трофических и гнойно-некротических поражений у больных с СДС.	69
§3.1.4. Показатели измерения перкутанного напряжения кислорода в группах пациентов с СДС.....	72
ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ VEGFAG634C, IL-6C174G И TNF-A G308A У БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ.	74
§4.2. Изучение места полиморфизма C174G в гене IL6 и их роли в развитии синдрома диабетической стопы	85
§4.3. Анализ частоты распределения полиморфизма полиморфизм G308A в гене TNF – α у больных СДС	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	118
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и востребованность темы монографии. В мировом масштабе частота нетравматических ампутации нижних конечностей достигает 50–75 % и это число представлено пациентами с синдромом диабетической стопы (СДС). Согласно материалам, опубликованным в Диабетическом атласе Международной Федерации Диабета (IDF), 463 миллиона взрослых людей в настоящее время живут с сахарным диабетом (СД). Одним из наиболее тяжелых и грозных осложнений сахарного диабета, является синдром диабетической стопы. По оценкам, примерно у каждого шестого больного, страдающего сахарным диабетом, развивается синдром диабетической стопы. При развитии СДС у больных сахарным диабетом резко увеличивается риск инвалидизации, летальных исходов и это может произойти в течение очень короткого промежутка времени. В настоящее время «...в патогенезе микро- и макроангиопатии при СД ведущие роли отводятся развивающемся хроническому воспалению и нарушению процессов ангиогенеза, влияние на которые оказывают провоспалительные цитокины IL6 и TNF – а, а так же фактора роста эндотелия сосудов – VEGFA...»¹. Однако, достаточно редкими являются публикации о влиянии и интерлейкина 6 (IL6), фактора некроза опухоли - а (TNF–а) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) на патогенетические механизмы, ведущие к возникновению и прогрессированию СДС. Известно, что степень активности биоактивных веществ сильно зависит от уровня экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих их производство. Исходя из этого, оценка роли и места полиморфизмов генов VEGFA, IL6 и TNF – а при СДС представляют большой интерес и важность для современной медицины, так до настоящего времени не изучены в полной степени частоты их распределения в зависимости от степени тяжести СДС, их влияние на прогрессирование и риск возникновения осложненных форм СДС.

¹ Hu, Y. J., Song, C. S., Jiang, N. Single nucleotide variations in the development of diabetic foot ulcer: A narrative review // World journal of diabetes – 2022.- №13(12). – P.1140–1153. doi:10.4239/wjd.v13.i12.1140

Во всем мире выполняется ряд научных исследований, направленных на изучение клинико-лабораторных, молекулярно-генетических аспектов патогенеза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом. Особое значение имеют научные изыскания, направленные на изучение роли полиморфизма гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) в формировании и развитии синдрома диабетической стопы, частоты полиморфизмов генов интерлейкина 6 (IL6), фактора некроза опухоли - α (TNF- α) в развитии и патогенезе СДС при сахарном диабете и их взаимосвязь с клинико-лабораторными признаками СДС, взаимной ассоциации полиморфизмов генов факторов роста эндотелия сосудов (VEGFA) и интерлейкина 6 (ИЛ6), фактора некроза опухоли α (TNF- α) и их значение в ранней диагностике, прогнозирование развития и клинического течения синдрома диабетической стопы.

В нашей стране реализуются комплексные меры, направленные на развитие системы здравоохранения, ее адаптацию к требованиям мировых стандартов, в том числе разработку комплексного подхода к устранению соматических заболеваний, вызванных воздействиями различных факторов. В связи с этим, в соответствии с семью приоритетными направлениями Стратегии развития Нового Узбекистана на 2022–2026 годы, в поднятии уровня медицинского обслуживания населения на новый уровень, определены такие задачи, как «...повышение качества оказания квалифицированных услуг населению первичной медико-санитарной службой...»². Исходя из этих задач целесообразно проведение исследований по изучению клинико-лабораторных и молекулярно-генетических аспектов патогенеза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

Данное научное исследование в определенной степени служит выполнению задач, обозначенных в Указах Президента Республики

² Указ Президента Республики Узбекистан от 28.01.2022 г. № УП - 60 «О стратегии развития Нового Узбекистана на 2022-2026 годы». Сборник законодательных актов.

Узбекистан № УП-60 «О Стратегии развития Нового Узбекистана на 2022–2026 годы» от 28 января 2022 года, № УП-5590 «О комплексных мерах по коренному улучшению системы здравоохранения Республики Узбекистан» от 7 декабря 2018 года, в Постановлениях Президента Республики Узбекистан № ПП-3071 «О мерах по дальнейшему развитию оказания специализированной медицинской помощи населению Республики Узбекистан в 2017–2021 годах» от 20 июня 2017 года, № ПП-4887 «О дополнительных мерах по обеспечению здорового питания населения» от 10 ноября 2020 года, № ПП-4295 «Об утверждении Национальной программы по совершенствованию эндокринологической помощи населению республики на 2019–2021 годы» от 19 апреля 2019 г., а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данном направлении.

Соответствие исследования приоритетным направлениями развития науки и технологий республики. Настоящая работа выполнена в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологии Республики Узбекистан VI «Медицина и фармакология».

Степень изученности проблемы. Известно, что СДС как маркер неэффективности медикаментозного лечения СД увеличивает инвалидизацию пациентов, снижает качество жизни и способствует высокой заболеваемости, смертности и затратам на здравоохранение, однако роль молекулярно-генетических аспектов в возникновении и прогрессировании СДС окончательно не выяснены (Saluja S. et al., 2020). Во всём мире работ, посвящённых поискам полиморфных маркеров, являющихся модуляторами формирования и прогрессирования СДС очень мало. Достоверных критериев раннего выявления СДС, прогноза его развития всё ещё остаются не до конца установленными. Это требует дальнейших всесторонних исследований для оценки роли различных молекулярно-генетических нарушений для повышения эффективности и своевременного выявления у пациентов СДС, профилактики его перехода в тяжёлые формы (Троицкая Н.И. и соавт., 2017, Awasthi A. et al., 2021). Эти мировые данные

неоднозначны, противоречивы и индивидуальны вследствие этнической гетерогенности изученных выборок пациентов и популяционных особенностей генетических полиморфизмов генов IL6, TNF – а и VEGFA. На вопрос о том, какие именно взаимодействия приобретённых и генетических факторов определяют особенности течения СДС, ответа до настоящего времени нету. На сегодняшний день среди учёных во всём мире общепризнанным считается то, что при развитии и прогрессирование СДС участвует не один, а несколько генетических полиморфизмов, которые отдельно или в совокупности нередко могут стимулировать риск возникновения синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом (Русанов А.В. и соавт., 2018, Veves A. et al, 2019). Всё выше изложенное обосновывает важность и необходимость всестороннего исследования значения отдельных генетических нарушений, которые могут повлиять на достоверность диагностики и оценку процессов хронического воспаления и нарушения ангиогенеза при СДС. В последнее десятилетие пристальное внимание уделено изучению наличия генетических нарушений у больных с СДС. Но даже на сегодняшний день нет единого мнения об истинных причинах развития СДС при наличии различных генетических мутаций (HuY.J. et al., 2022).

В Узбекистане проводится ряд научных исследований направленных на изучение патогенеза и улучшение результатов лечения различных соматических заболеваний (Каримов Х.Я., 2021, 2022, 2023; Ирискулов Б.У., 2022,2023; Гадаев А.Г., 2022, Алейник В.А., 2022,2023), однако, до настоящего времени не проводились исследования по изучению клинико-лабораторных и молекулярно-генетических аспектов патогенеза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

Исходя из этого, возникает необходимость более детального изучения вероятных связей определённых генетических мутаций с достоверной диагностикой, клинической картиной синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом и прогнозом заболевания. В связи с этим,

весьма актуальными являются проведение в Узбекистане комплексных клинических и молекулярно-генетических исследований, которые способствуют прогрессу в изучение патогенеза синдрома диабетической стопы.

Связь монографии с планами научно-исследовательских работ высшего образовательного учреждения, где выполнена научная работа.

Научное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Андижанского государственного медицинского института в рамках темы № 012000275: «Изучение регуляторных механизмов различных систем организма человека в физиологии и патологии» (2018-2022).

Цель исследования – совершенствование оценки взаимосвязи мутации генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), интерлейкина – 6 (IL6) и фактора некроза опухоли – α (TNF - α) с клинико-лабораторными особенностями и прогнозом течения синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

Задачи исследования.

оценка спектра хромосомных aberrаций генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), интерлейкина – 6 (IL6) и фактора некроза опухоли – α (TNF - α) у больных с синдромом диабетической стопы с различными клинико-лабораторными и молекулярно-генетическими статусами;

оценка полиморфного спектра гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) в формировании и развитии синдрома диабетической лодыжки при сахарном диабете;

оценка частоты и значения полиморфизмов генов интерлейкина 6 (IL6), фактора некроза опухоли α (TNF- α) развитии и прогрессирование синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом;

оценка взаимосвязи полиморфизмов генов интерлейкина 6 (IL6), фактора некроза опухоли - α (TNF – α) и фактора роста эндотелия сосудов

(VEGFA) с клинико-лабораторными характеристиками СДС у больных сахарным диабетом;

усовершенствование алгоритма ранней диагностики, развития и клинического течения синдрома диабетической лодыжки у больных сахарным диабетом.

Объектом исследования служили 96 больных, находившихся на стационарном лечении в клинике Андижанского Государственного медицинского института и Андижанском областном диспансере эндокринологических заболеваний в период с 2021 по 2022 гг., из них с нейропатической (n=35) и с нейроишемической (n=61) формами СДС, а также 83 «условно-здоровых» лиц без клинических проявлений сахарного диабета на момент обследования и в анамнезе, не имеющими у себя и близких родственников, страдающих сахарным диабетом.

Предметом исследования являлась взятая у больных с СДС венозная кровь, которая исследовалась для углубления представления о клинико-лабораторных, молекулярно-генетических аспектах патогенеза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом полиморфизмы генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) - rs2010963, интерлейкина – 6 (IL6) rs1800795 и фактора некроза опухоли – α (TNF - α) - rs1800629.

Методы исследования. Для определения клинико-лабораторных и молекулярно-генетических аспектов патогенеза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом использованы клинические, инструментальные, биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые установлена роль полиморфизмов генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), интерлейкина 6 (IL6) и фактора некроза опухоли α (TNF- α) в этиопатогенезе синдрома диабетической стопы;

доказана встречаемость полиморфизмов генов интерлейкина 6 (IL6) и фактора некроза опухоли α (TNF- α) у больных с синдромом диабетической

стопы и доказано взаимосвязь этих генетических полиморфизмов с инструментальными и клинико-лабораторными показателям клинических вариантов синдрома диабетической стопы;

доказана роль мутационного варианта полиморфизма G634C гена VEGFA в развитии дефицита гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), его уровень и прогностическое значение в формировании и прогрессировании синдрома диабетической стопы, в развитие нарушения ангиогенеза, лежащего в основе развития данной патологии;

доказан значимый аддитивный эффект комбинации однонуклеотидных полиморфизмов генов IL6 (S174G), TNF- α (G308A) и VEGFA(G634C) в ухудшении прогноза и прогрессировании течения заболевания у больных с синдромом диабетической стопы.

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

выявление полиморфных мутации генов интерлейкина 6 (IL6), фактора некроза опухоли - α (TNF - α) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) расширило возможности ранней и достоверной диагностики СДС у больных сахарным диабетом;

оцененно, что течение СДС у больных сахарным диабетом становится более тяжелым, когда у пациентов одновременно обнаруживаются полиморфизмы генов, влияющих на экспрессию цитокинов, интерлейкина 6 (IL6), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), и фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA);

установленна необходимость проведения обследования пациентов не по одному, а по нескольким генетическим маркерам, влияющим на патогенез СДС у больных сахарным диабетом,

усовершенствованн алгоритм своевременной и достоверной диагностики синдрома диабетической стопы у больных с сахарным диабетом, учитывающий выявление полиморфизмов в генах цитокинов, интерлейкина – 6 (IL6), фактора некроза опухоли – α (TNF - α), и фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), который позволяет своевременно и

достоверно диагностировать развитие синдрома диабетической стопы у пациентов с сахарным диабетом.

Достоверность результатов исследования основана на применении в работе теоретических подходов и методов, методологической правильности проведенного исследования, выборе достаточного количества материала, современности использованных методов, специфичности совершенствования клиничко-лабораторных, молекулярно-генетических аспектов патогенеза синдрома диабетической голеностопного сустава у больных сахарным диабетом на основе взаимодополняющих клинических, инструментальных, биохимических, молекулярно-генетических и статистических методов исследования, сопоставлении полученных данных с международным и отечественным опытом, утверждении заключения и полученных результатов полномочными структурами.

Научная и практическая значимость результатов исследования.

Научная значимость результатов исследования объясняется тем, что с помощью современных молекулярно-генетических исследований установлена достоверная патогенетическая связь между вариантами полиморфизмов генов цитокинов, IL6 - rs1800795 (C174G), TNF – α - rs1800629 (G308A), и фактора роста эндотелия сосудов VEGFA - rs2010963 (G-634C) с формированием и прогрессированием СДС у больных сахарным диабетом, что свидетельствует о целесообразности включения этих маркеров в алгоритм диагностики и прогнозирования клинического течения заболеваний.

Практическая значимость результатов исследования объясняется тем, что на основе этих данных усовершенствован алгоритм генетической диагностики синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом, позволяющий своевременно верифицировать его различные варианты и прогнозировать особенности клинического течения данной патологии. Кроме этого, показана необходимость обязательного проведения молекулярно-генетического исследования у больных с синдромом диабетической стопы с

целью выявления генетических маркеров, имеющих диагностическое и прогностическое значение.

Внедрение результатов исследования. Согласно заключению Координационно-экспертного совета Андижанского государственного медицинского института № 06/12 от 31 мая 2023 года (о внедрении научных результатов в другие учреждения здравоохранения в Министерство здравоохранения направлено письмо Андижанского государственного медицинского института № 06/12 от 31 мая 2023 года):

роль полиморфизмов генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), интерлейкина 6 (IL6) и фактора некроза опухоли α (TNF- α) в этиопатогенезе синдрома диабетической стопы внедрены в практику приказом клиник Андижанского государственного медицинского института (09.11.2022; №91/1), Андижанского областного многопрофильного медицинского центра (14.11.2022; №34/1), Андижанского областного филиала (19.11.2022; №255/1), Наманганского областного филиала (16.11.2022; №256/13) и Ферганского областного филиала Республиканского научного центра скорой медицинской помощи (19.11.2022; №257/1). Социальная эффективность научной новизны заключается в следующем: проводимые предрективные мероприятия по выявлению множественных факторов ведущих к развитию СДС позволяют заблаговременно, до появления клинических симптомов, начинать комплекс персонализированных профилактических и лечебных мероприятий, что приводит к улучшению состояния больных, улучшения их качества жизни и уменьшению катастрофических осложнений. Экономическая эффективность научной новизны заключается в следующем: медико-генетическое консультирование и предсимптомное тестирование ДНК особенно важно для людей с положительным семейным анамнезом на наличие сахарного диабета 2 типа, для выявления групп риска формирования СДС, что позволило снизить частоту осложненных форм СДС. Это несет большую экономическую выгоду, снижая затраты на госпитализацию, последующую

реабилитацию и уход за больными. Ранее выявление групп риска развития СДС позволяет избегать госпитализации и экономит на 1 больного в среднем до 2 600 000 сум за 14 суток госпитализации в стационаре (согласно прејскуранту клиники Андижанского государственного медицинского института, 1 день лечения в больнице составляет 190 000 сум). Заключение: использование предложенных методов обследования у населения с риском развития СДС позволило сэкономить бюджетных средств на 1 862 сум и внебюджетных средств на 798 000 сум в расчете на 1 больного;

встречаемость полиморфизмов генов интерлейкина 6 (IL6) и фактора некроза опухоли α (TNF- α) у больных с синдромом диабетической стопы и доказано взаимосвязь этих генетических полиморфизмов с инструментальными и клинико-лабораторными показателям клинических вариантов синдрома диабетической стопы внедрены в практику приказом клиник Андижанского государственного медицинского института (09.11.2022; №91/1), Андижанского областного многопрофильного медицинского центра (14.11.2022; №34/1), Андижанского областного филиала (19.11.2022; №255/1), Наманганского областного филиала (16.11.2022; №256/13) и Ферганского областного филиала Республиканского научного центра скорой медицинской помощи (19.11.2022; №257/1). Социальная эффективность научной новизны заключается в следующем: выявление у больных с сахарным диабетом полиморфизма C174G гена IL6 и полиморфизма G308A в гене TNF- α говорит о высоком риске развития гнойно-некротических осложнений, которые в конечном итоге ведут к ампутации конечности и стойкой инвалидности больного. Экономическая эффективность научной новизны заключается в следующем: снижение числа ампутаций по поводу СДС ведет к экономии в среднем 747 000 сум на одного больного, так как после ампутации конечности больным назначается 2 группа инвалидности (пенсия по 2 группе инвалидности равна 747 000 сум в месяц). Заключение: проведение исследования у больных сахарным диабетом 2 типа

полиморфизмов полиморфизма C174G гена IL6 и полиморфизма G308A в гене TNF- α показало свою эффективность и экономическую необходимость для разработки предективных методов профилактики и лечения СДС, что дало возможность сэкономить 747 000 сум бюджетных средств в расчете на 1 больного в месяц;

роль мутационного варианта полиморфизма G634C гена VEGFA в развитии дефицита гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), его уровень и прогностическое значение в формировании и прогрессировании синдрома диабетической стопы, в развитие нарушения ангиогенеза, лежащего в основе развития данной патологии внедрены в практику приказом клиник Андижанского государственного медицинского института (09.11.2022; №91/1), Андижанского областного многопрофильного медицинского центра (14.11.2022; №34/1), Андижанского областного филиала (19.11.2022; №255/1), Наманганского областного филиала (16.11.2022; №256/13) и Ферганского областного филиала Республиканского научного центра скорой медицинской помощи (19.11.2022; №257/1). Социальная эффективность научной новизны заключается в следующем: носительство мутационных полиморфных вариантов G634C в гене VEGFA ведет к прогрессированию эндотелиальной дисфункции, в 3,5 раза повышает риск перехода нейропатической формы СДС в нейроишемическую форму СДС. Если своевременно не принять необходимые меры по профилактике, носительство генетической наследственной склонности к СДС у пациентов с СД 2 типа может в дальнейшем стать причиной его развития и прогрессирования. Экономическая эффективность научной новизны заключается в следующем: в результате уменьшения тяжелых форм СДС при сахарном диабете сроки пребывания в стационаре сокращены с 14 до 10 дней, а стоимость пребывания в стационаре снижена до 760 000 сум (согласно прейскуранту клиники Андижанского государственного медицинского института, 1 день лечения в больнице составляет 180 000 сум).

Заключение: выявление мутационных полиморфизмов в гене VEGFA у больных сахарным диабетом является предиктором развития и обострения синдрома диабетической стопы, разработанные индивидуальные подходы к диагностике, профилактике и лечению больных с СДС, экономят бюджетных средств на 532 000 сум и внебюджетных средств на 228 000 сум в расчете на 1 больного;

значимый аддитивный эффект комбинации однонуклеотидных полиморфизмов генов IL6 (S174G), TNF- α (G308A) и VEGFA(G634C) в ухудшении прогноза и прогрессировании течения заболевания у больных с синдромом диабетической стопы внедрены в практику приказом клиник Андижанского государственного медицинского института (09.11.2022; №91/1), Андижанского областного многопрофильного медицинского центра (14.11.2022; №34/1), Андижанского областного филиала (19.11.2022; №255/1), Наманганского областного филиала (16.11.2022; №256/13) и Ферганского областного филиала Республиканского научного центра скорой медицинской помощи (19.11.2022; №257/1). Социальная эффективность научной новизны заключается в следующем: выявление у пациента мутаций в исследуемых генах позволило с большой достоверностью предсказать формирование у больного СДС. При выявлении у пациентов носительства одного полиморфизма генов IL6, TNF- α и VEGFA прогноз считается более благоприятным, чем при носительстве сочетания этих генетических мутаций. Экономическая эффективность научной новизны заключается в следующем: в результате ранней диагностики и профилактики синдрома диабетической голеностопного сустава у больных сахарным диабетом, отпадает необходимость в 14-дневном стационарном лечении. Достигнута экономия в размере 2 660 000 сум (согласно преискуранту клиники Андижанского государственного медицинского института, 1 день лечения в больнице составляет 180 000 сум). Заключение: с учетом «ген-генного» взаимодействия у больных сахарным диабетом, с использованием

разработанного алгоритма риска возникновения синдрома диабетической стопы, экономит бюджетных средств на 1 862 000 сум и внебюджетных средств на 798 000 сум в расчете на 1 больного.

Апробация результатов исследования. Результаты данного исследования были обсуждены на 4-х научно-практических конференциях, в том числе, на 2-х международных и 2-х республиканских научных конференциях.

ГЛАВА I. СОВРЕМЕННАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ОЦЕНКИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

§ 1.1. СИНДРОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ КАК ЗНАЧИМАЯ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНАЯ И ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

Синдром диабетической стопы - это комплекс анатомических и функциональных изменений, развивающихся на фоне диабетической нейропатии, микро- и макрососудистых заболеваний и остеоартроза, приводящих к увеличению повреждения мягких тканей и инфицированию стопы, развитию пиогенно-некротических процессов и ампутации в поздних стадиях³. Синдром диабетической стопы - это общий термин для группы поздних осложнений сахарного диабета, при которых патологические изменения, такие как пиогенно-некротические процессы, язвы и остеоартрозные поражения, возникают в стопах пациентов на фоне специфических изменений в периферических нервах, сосудах, коже, мягких тканях, костях и суставах. В 1987 году на заседании Исследовательской группы Всемирной организации здравоохранения в Женеве синдром диабетической стопы был признан в качестве самостоятельной нозологической единицы [39; с.47-48].

Синдром диабетической стопы у больных сахарным диабетом, в последние десятилетие приобретает все большее значение [108; с.148]. Об этом свидетельствует высокая смертность и частота ампутаций нижних конечностей, а также большая значимость СД в контексте социально-медицинских проблем, требующих значительных интеллектуальных, организационных и финансовых ресурсов для новых решений [18; с.77-85, 16; с.170-177]. СДС осложняет течение СД у 4-25% пациентов. Риск развития гангрены нижних конечностей в 20 раз выше, чем в общей популяции [118;

³ [https://ru.wikipedia.org/wiki/Диабетическая стопа](https://ru.wikipedia.org/wiki/Диабетическая_стопа)

с.58-60]. Во всем мире почти каждую минуту у пациентов с СДС ампутируют нижнюю конечность. Частота послеоперационных осложнений у этих пациентов составляет 37%, а послеоперационная смертность колеблется от 9 до 26% [120; с. 87-88, 116; 194-196 , 172; с. 515, 5; с. 29-32, 53; 116-118]. Следует отметить, что проведение операции ампутаций нижних конечностей, причиной которых стал СДС, связаны с высоким уровнем летальности: 16,7% через 12 месяцев и более 50% через 5 лет, что является худшим показателем, чем при большинстве видов злокачественных опухолей [85; с. 39–50].

За последние три десятилетия синдром диабетической стопы (СДС) стал более распространенным в связи с ростом заболеваемости сахарным диабетом (СД) [163; с. 507–518] .

В настоящее время в Республике Узбекистан состоит на учете 230 тысяч пациентов с сахарным диабетом. По экспертным оценкам, распространенность сахарного диабета в Узбекистане составляет 7,9 %, а расчетное количество пациентов достигает 2 370 000 человек. Иными словами, в Республике Узбекистан не диагностированных пациентов с сахарным диабетом в 10 раз больше, чем официально зарегистрированных [4; с. 69]. Согласно последним данным ВОЗ, опубликованным в 2020 года, число смертельных случаев от сахарного диабета в Узбекистане достигло 6.205 или 3,84% от общей смертности. Скорректированная по возрасту смертность составляет 25,76 на 100 000 населения, занимает Узбекистан 96 место в мире [187]⁴.

Согласно последнему Национальному статистическому отчету по диабету, подготовленному Центрами по контролю и профилактике заболеваний США, 30 миллионов взрослых в Соединенных Штатах Америки страдают диабетом, а 84,1 миллиона человек находятся в преддиабетическом состоянии [Centers for Disease]. Двадцать процентов госпитализаций по

⁴ <https://www.worldlifeexpectancy.com/ru/uzbekistan-diabetes-mellitus>

поводу диабета в Соединенных Штатах связаны с СДС. Целлюлит, миозит, тендинит или остеомиелит встречаются более чем в половине всех случаев СДС. Увеличение заболеваемости сахарным диабетом сопровождается увеличением частоты СДС, глубоких инфекций тканей и ампутаций [149,11-21].

Zhang et al. в проведенном глобальном метаанализе сообщили о распространенности СДС у 6,3% населения, при этом в Северной Америке самая высокая распространенность СДС в мире (13,0%). Далее следуют Африка (7,2%), Азия (5,5%), Европа (5,1%) и Океания (3%). Страны с самой высокой распространенностью СДС включают Бельгию (16,6%), Канаду (14,8%) и США (13,0%). Более того, ожидается, что из-за эпидемии ожирения и старения населения эти цифры будут продолжать расти [149; с.115-130, 192; с. 106-116].

Согласно тому же метаанализу, группами, наиболее подтвержденными риску развития СДС, были: мужчины с диабетом 2 типа и низким индексом массы тела (средний ИМТ составлял $23,8 \pm 1,7$ у больных СД, осложненным СДС и $24,4 \pm 1,7$ у больных СД без СДС), больные, с более длительной продолжительностью сахарного диабета (в среднем $11,3 \pm 2,5$ года у больных СД, осложненным СДС по сравнению с $7,4 \pm 2,2$ года у больных СД без СДС), наличие диабетической ретинопатии, курение и артериальная гипертензия в анамнезе [149; с.115-130, 192; с. 106-116].

Проведенное Wang et al. ретроспективное исследование обнаружило аналогичную тенденцию и у китайских пациентов: СДС чаще встречался у мужчин, а прогноз заболевания ухудшался с возрастом. В среднем мужчины болели более тяжелыми инфекциями и ампутации у них были проведены на 10 лет раньше, чем женщины. У женщин раневые дефекты заживали быстрее, что может быть связано с более высоким уровнем эстрогена [179; с. 229-236].

В Узбекистане проводятся широкие исследования посвященные исследованию патогенеза, факторам риска возникновения осложнений у больных СД, в том числе и СДС, а также разработке современных методов

диагностики и лечения этой тяжелой патологии [82; с. 28-42, 117; с. 473-478, 119; с. 1193-1196, 123; с. 135-139, 146; с. 1518-1523, 7; с. 11-15, 8; с.91-97, 28; с. 174-176]. Однако, научных работ посвященных изучению молекулярно-генетических составляющих патогенеза СДС нами не было обнаружено.

СДС становится ведущей причиной развития инвалидности у больных СД. Большинство, 56,6%, случаев инвалидности у людей с СД связано с синдромом диабетической стопы. Частота инвалидности вследствие синдрома диабетической стопы выше у мужчин (56,3%), у пожилых (67,8%) и с нейроишемической формой СДС (48,3%). Пациентам с синдромом диабетической стопы в основном присваивалась инвалидность II группы (52,9%) [31; с. 27-33].

Высокие ампутации также связаны с уменьшением ожидаемой продолжительности жизни [177; с. 655-673]. Пациенты, перенесшие большие ампутации, часто умирают от осложнений сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, нарушение мозгового кровообращения). Профилактика высоких ампутаций имеет первостепенное значение, поскольку позволяет сохранить у больного способность передвигаться и избежать осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. Люди с ампутированными конечностями часто испытывают резкие изменения образа жизни, включая потерю независимости и эмоциональный стресс[40; с. 1613–1620]. Эти факторы усугубляются в развивающихся странах, где доступ к таким ресурсам, как протезирование и психиатрическая помощь, ограничен. [62; с. 66]. Ампутация не только кардинально меняют жизнь, но и является дорогостоящей процедурой. Исследования показали, что хирургическая процедура ампутации нижних конечностей и последующий уход, включая услуги по реабилитации, дом престарелых и медицинские расходы, стоит в США от 43 800 до 66 215 долларов США [144; с. 29-31]. Кроме того, ампутация нижней конечности подвергает контралатеральную конечность риску осложнений из-за повышенных функциональных требований.

Экономическое влияние СДС также имеет далеко идущие последствия. В совокупности на уход за диабетической стопой в Соединенных Штатах ежегодно тратится 9 миллиардов долларов, что превышает годовую стоимость лечения рака молочной железы или колоректального рака. Трофические язвы, являющиеся кульминацией СДС у больных сахарным диабетом, обходятся системе здравоохранения США более чем в 1 миллиард долларов в год [144; с.29-31]. Стоимость лечения огромна, но она не включает косвенные расходы, связанные с потерей дохода, работы или возможностей. К сожалению, эти вторичные затраты часто трудно измерить, а фактическое экономическое воздействие СДС может быть намного выше, чем сообщается в настоящее время. В целом эта информация свидетельствует о том, что инвестиции в профилактику и раннее выявление СДС у больных сахарным диабетом являются экономически эффективными [149; с.115-130].

Поздняя диагностика случаев сахарного диабета для Республики Узбекистан представляет не только медицинскую, но и социально-экономическую проблему. Это связано с тем, что лечение сахарного диабета при уже развившихся макро - и микрососудистых осложнениях не только малоэффективно с медицинской точки зрения, но и несёт большие экономические затраты для государства в целом, с точки зрения значительного количества средств, направленных на лечение осложнений, а также необходимости использования более дорогих лечебных и диагностических процедур [3; с.60-69].

Учитывая высокую распространенность, заболеваемость и экономическое бремя СДС, диагностические методы, которые дают возможность эффективно и точно диагностировать СДС ещё до начала манифестации заболевания имеют решающее значение для клинических результатов [141; с.32-42]. Без этих диагностических приёмов у больных СД имеется неудовлетворительный прогноз на выздоровление [183; с. 33].

Таким образом, данные национальных и международных регистров, проведенных крупных эпидемиологических исследований и мета-анализов,

показывают, что, СДС является серьезной проблемой, затрагивающей социальные, медицинские и экономические аспекты, и с каждым годом растет число больных СДС во всем мире. Решение этой проблемы имеет большое значение для здоровья современного общества.

В связи с этим, выявление пациентов, имеющих предрасположенность к развитию СДС у больных сахарным диабетом на стадии ещё до появления клинических проявлений, является особенно актуальным вопросом современной медицины [49; с.549-557]. Экспрессия биологических маркеров, играющих важную роль в формировании СДС, кодируется соответствующими генами, наличие полиморфизмов в которых может существенно влиять на выработку данных веществ. Значимость проявления полиморфизма генов и его роль в патогенезе развития СДС и его осложненных форм во многом определяется своеобразием разных популяций. Знание специфики распределения полиморфизмов генов-кандидатов в зависимости от этнической принадлежности необходимо для оценки риска возникновения СДС и его распространенности среди жителей региона. [41; с. 34–41].

Все выше перечисленное свидетельствует о насущной необходимости более глубокого изучения молекулярной и генетической основы СДС для того что бы, подробнее выяснить этиологию и патологические механизмы этого заболевания и разработать новые методы его персонализированного лечения, ориентированного на конкретные группы пациентов [112; с.229-236, 165; с.61-72, 151; с.8691].

§ 1.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.

В последние годы был достигнут значительный прогресс в лечении СДС, но не смотря на это многие случаи в конечном итоге переходят в хронические раны в результате возникающих необратимых процессов [143]. Поэтому важно понять молекулярные механизмы, регулирующие развитие

СДС, чтобы помочь в профилактике и лечении этой тяжелой, изнурительной патологии [167; с.323–331].

В основе патогенеза СДС лежат различные этиологические причины. Его тяжесть напрямую зависит от длительности сахарного диабета (СД). Основой для изменений сосудистой стенки является длительное воздействие гипергликемии [37; с.94-97, 171; с. 31-39, 102; с. 150]. Длительная гипергликемия приводит наряду с микрососудистыми осложнениями к макрососудистым осложнениям, такими как диабетическая нефропатия, ретинопатия и синдром диабетической стопы [88;с.537–543,153; с.211–218]. Связанная с диабетом периферическая невропатия и заболевание периферических артерий со временем могут привести к деформации ног и незаживающим язвам. В конечном итоге нарушение процесса заживления ран приводит к деформации ног и необходимости ампутации нижних конечностей [161; с.3–30, 93; с.42, 189; с.25-31].

Воздействие повышенной внутриклеточной концентрации глюкозы приводит к полиоловому пути, чрезмерному производству сорбита, неферментативному гликированию белков, активации протеинкиназы С, возникновения окислительного стресса, уменьшению экспрессии вазодилататоров (оксида азота, простагландинов), изменению активности Na^+ - K^+ -АТФазы и блокированию синтеза миоинозитола [184; с.23-31].

Полиоловый путь отвечает за снижение концентрации токсичных альдегидов, образующихся под воздействием ROS в физиологической среде, путем вовлечения их метаболизма до неактивных спиртов. Альдозоредуктаза, основной, но лимитирующий фермент этого пути, использует никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) в качестве кофактора [60; с. 318-323].

Это объясняется тем, что в условиях гипергликемии повышается активность альдозоредуктазы, глюкоза превращается в сорбит, а затем во фруктозу, и концентрация NADPH, необходимого для функционирования глутатионредуктазы, значительно снижается. В результате происходит

уменьшение скорости аксонального транспорта, апоптозу клеток эндотелия и развитию эндотелиальной дисфункции (ЭД) [83; с.20-33, 84; с.118-125].

Уровень неферментативного гликирования белков имеет корреляционную связь с гипергликемией и увеличивается из-за окислительного стресса. Начальная неферментативная реакция гликирования обратима, но последующие превращения, включающие дегидратацию, окисление и восстановление, приводят к образованию долговременных конечных продуктов гликирования (AGEs) [56; с.126-134]. Таким образом, продукция и накопление гликотоксинов в условиях гипергликемии является важным компонентом повреждения эндотелия сосудов; CRP активно образует ковалентные связи с белками, повышают проницаемость сосудов и активируют синтез цитокинов и факторов роста [109].

Гликотоксины имеют три основных механизма действия в патогенезе ЭД: внутриклеточный, межклеточный и внутрисосудистый. Первый механизм включает модификацию внутриклеточных белков, в том числе участвующих в регуляции транскрипции генов и внутриклеточной и межклеточной сигнализации [69; с. 84-88]. Синтез цитокинов и факторов роста и клеточная дисфункция активируются.

Межклеточные механизмы возникают в результате диффузии ЦПГ из клетки и характеризуются изменениями в молекулах внеклеточного матрикса. Меняется структура, заряд и растворимость этих молекул. Эти изменения приводят к межклеточному накоплению коллагена, фибронектина и ламинина, повышению проницаемости сосудов и увеличению связывания белков плазмы [152; с.10-14]. При третьем механизме (внутрисосудистом) предшественники CRP диффундируют в кровотоки и изменяют циркулирующие белки, такие как альбумин. Впоследствии модифицированные циркулирующие белки связываются и активируют рецептор CRP (AGE), вызывая выработку воспалительных цитокинов и факторов роста, что в дальнейшем приводит к микроангиопатии -

патологическому процессу, лежащему в основе развития и прогрессирования БА [129; с.28-35].

Рецепторы КРН были обнаружены на поверхности эндотелиальных клеток, макрофагов, клеток средостения и гладкомышечных клеток, когда КРН связывается с рецепторами, активируется экспрессия воспалительных генов и транскрипционный фактор NF-κB. ЭД занимает так же важное место в развитии диабетической нейропатии, так как через *vasa nervorum* питательные вещества попадают в нейроны [160; с.12-34, 99; с.572-580].

Фосфорилирование белковых молекул PKC является основной причиной многих патофизиологических каскадов, приводящих к активации воспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-8, TNF-α и VEGF). Повышенная проницаемость капилляров, нарушение микроциркуляции и чрезмерное производство компонентов внеклеточного матрикса [70; с.205-211, 186; с.28-35]. В условиях высокой концентрации глюкозы эндотелиальные клетки активно участвуют в метаболизме, метаболизируясь до глюкозо-6-фосфата и затем до фруктозо-6-фосфата в процессе гликолиза. Образующийся N-ацетилглюкозамин активно взаимодействует с остатками серина и треонина транскрипционных факторов, как в процессе фосфорилирования, но вызывает патологические изменения в выработке трансформирующего фактора роста-β1 (TGF-β1) и ингибитора активатора плазминогена-1, что негативно влияет на эндотелий сосудов [89; с. 27-36].

Гипергликемия увеличивает перенос электронов через митохондриальные ферменты во время декарбоксилирования пирувата глюкозы в цикле Кребса, что приводит к дисфункции митохондрий. Высокое содержание свободных радикалов, образующихся в условиях гемогликемии, приводит к нарушению механизмов целостности митохондрий, которые, в свою очередь, стимулируют их собственную продукцию [148; с.155-163].

ROS (в основном супероксид-анионы) участвуют во внутриклеточной сигнализации рецепторов эндотелина, TGF-β1, PDGF, AT-II и FGF-2 и меняют функциональную активность некоторых транскрипционных

факторов, таких как NF-κB и AP-1 [44; с.104-113]. Снижение целостности митохондрий активирует апоптоз клеток эндотелия, и это приводит к развитию диабетической микроангиопатии [122; с.233-245].

Производство свободных радикалов и модификация молекул белков, липидов и нуклеиновых кислот в результате гипергликемии продолжается даже тогда, когда уровень глюкозы возвращается к норме, что объясняет феномен метаболической памяти. В тканях, взятых из диабетических язв нижних конечностей, было обнаружено, что фибробласты из кожи около раны отличаются повышенной митотической активностью и измененной мРНК [72; с.310-311].

В последнее десятилетие при изучении молекулярных основ патогенеза сахарного диабета и его осложнений все большее внимание уделяется эпигенетическим факторам. Эпигенетические механизмы опосредуют геномные изменения активности генов в ответ на образ жизни и факторы окружающей среды. Интенсивное развитие эпигенетики за последние 30 лет позволило выявить молекулярную основу эпигенетических механизмов, с помощью которых живые организмы реагируют на факторы окружающей среды и образа жизни. Метаболические сдвиги в организме, происходящие в ранние критические периоды под влиянием неблагоприятных поведенческих и экологических детерминант, приводящие к формированию СД и его осложнений, могут быть скорректированы путем изменения образа жизни [22; с.467–474]. Таким образом, эпигенетика в настоящее время обеспечивает базовую основу и надежду на прогресс в улучшении здоровья человека с помощью профилактических мероприятий и ранее выявление предрасположенности к развитию заболевания. [27; с.115-120]. Эпигенетика изучает не генетические мутации, и изменения функциональной активности генов, которые происходят без изменения последовательности ДНК. Эпигенетические механизмы контролируют активность генов и развитие организма [75; с.1028-1044, 10; с.17-20]. Эпигеномный механизм включает метилирование ДНК, модификации гистонов и РНК-опосредованные

процессы, и нарушение этого баланса может вызывать ряд патологий и в том числе и сахарный диабет 2 типа, а так же способствовать формированию его осложнений [98;с.57-67,75;с.1028-1044]. Генетическая предрасположенность, а также старение способствуют эпигенетической изменчивости, а некоторые из факторов окружающей среды, включая физические упражнения и диету, дополнительно взаимодействуют с эпигеномом человека [85; с.39–50].

Метилирование ДНК - это ковалентная модификация ДНК под действием ДНК-метилтрансферазы, которая перемещает метильную группу на пятый углерод остатка цитозина с образованием 5-метилцитозина. Метилирование ДНК происходит в основном в динуклеотидах CpG [78; с.705., 134; с.22.]. Поскольку метилирование ДНК происходит в основном по нуклеотиду цитозину (C), а затем по гуанину (G), становится понятно, что генетические мутации, которые удаляют или вводят такие динуклеотиды CG, могут влиять на способность метилирования ДНК в данном положении. В нормальных клетках генома человека большинство динуклеотидов CpG метилированы, а остатки CpG, включая длинные регионы CpG, обычно свободны [10; с.7-20.]. Во время таких процессов, как дифференциация и импринтинг, промоторные области CpG могут быть метилированы, что приводит к инактивации генов, низкий уровень метилирования ДНК связан с активацией генов, а высокий уровень метилирования ДНК может приводить к блокированию функции соответствующих генов [38; с.104-115].

Аберрантные изменения метилирования ДНК были выявлены при некоторых многофакторных заболеваниях, в том числе и при сахарном диабете [64; с.707–715].

Одни из патологических звеньев в патогенезе СДС у больных сахарным диабетом является нарушение репаративных процессов при наличие раневых дефектов, что часто приводит к потере конечностей и инвалидности [85; с.39–50, 74; с.696-716]. Нормальное восстановление тканей проходит несколько этапов, а именно: воспаление, пролиферация и ремоделирование. При сахарном диабете нормальный процесс этих стадий

нарушается, что приводит к развитию хронического воспаления и нарушения эпителизации раны [78; с.705]. Благодаря своей пластичности макрофаги играют важную роль в переходе от фазы воспаления к фазе пролиферации. Сахарный диабет нарушает функцию макрофагов, препятствуя проникновению моноцитов в рану, снижая фагоцитоз и предотвращая переход воспалительных макрофагов в противовоспалительное состояние [68; с. 17–24, 190; с.33]. СД также влияет на функцию кератиноцитов и фибробластов на более поздних стадиях, что приводит к нарушению эпителизации раны. В проведенных исследованиях было показано, что изменения в эпигенетической регуляции иммунных и структурных клеток в ранах влияют на клеточный фенотип и процессы заживления, особенно при таких патологических состояниях, как СДС [138; с.1065–1072]. Выявлено, что пластичность макрофагов во время заживления ран частично регулируется эпигенетически, а СД изменяет этот эпигенетический контроль, способствуя тем самым развитию персистирующего воспалительного состояния, которое выражается в увеличении концентрации провоспалительных цитокинов и угнетением процессов ангиогенеза [121; с.59–71].

Наряду с этим, эпигенетические модификации у пациентов с СД могут в привести к развитию макро- и микрососудистых осложнений. В выполненных за последние годы научных работах показана связь эпигенетических изменения с сосудистыми осложнениями сахарного диабета, такими как ретинопатия, диабетическая нефропатия, синдром диабетической стопы [66; с.989-1002, 76; с.3002-3011, 2; с.184-203]. Эти исследования выявили эпигенетические изменения у больных СД и продемонстрировали то, что они играют одну из ведущих ролей в формировании патологической картины сахарного диабета, а так же его сосудистых осложнений [87; с.120-139] Высокий уровень концентрации глюкозы и продуктов ее модификации, конечных продуктов предварительного гликирования, вызывают двунаправленную активацию

эпигенетических и воспалительных механизмов в клетках эндотелия сосудов, что приводит к хроническому воспалительному процессу и в конечном итоге ведет к развитию сосудистых осложнений СД [87; с. 120-139]

Множественные эпигенетические изменения имели четкую взаимосвязь с дифференцированной экспрессией генов [75; с.1028-1044] Появляется все больше данных, связывающих поздние осложнения диабета с эпигенетическими механизмами [95; с.21–25, 113; с.12695–12707, 131; с.36-45, 133; с.461–469] Длительная гипергликемия ведет к возникновению аномальных эпигенетических маркеров, которые сохраняются даже после установления и поддержания нормогликемической среды, что свидетельствует об участии эпигенетики в феномене «метаболической памяти», который связан со значительным эпигенетическим перепрограммированием клеток [182; с.1–10, 87; с.120-139, 170; с.10-19] Эти маркеры могут быть использованы в качестве биомаркеров для раннего выявления риска микро- и макрососудистых осложнений сахарного диабета [78; с.705]

Следовательно, в основе патогенеза сосудистых осложнений при СД, лежат взаимосвязанные между собой патологические звенья: каскад нарушений метаболизма, что ведет к гиперпродукции ЦППГ и факторов роста, сложные патофизиологические процессы, ведущие к нарушениями в системах микроциркуляции и гемостаза, а так же изменения в экспрессии генов, которые в основе своей имеют наследственные и эпигенетические механизмы [67; с.153–192, 78; с.705, 111; с.537–545, 142; с.284-292]

Таким образом, артериальный атеросклероз, избыточная адгезия лейкоцитов, повышенная проницаемость сосудов, нарушение гемостаза, изменение пролиферации сосудистых клеток и их апоптоз являются причинными факторами развития диабетической ангиопатии, играющей ведущую роль в патогенезе СДС. [149; с.115-130].

В дополнение к снижению перфузии при сахарном диабете имеет место дисфункции иммунной системы [178; с.30-38.]. У пациентов с СД часто

имеется нарушение функции нейтрофилов независимо от гликемического статуса, включая снижение продукции хемотаксических факторов, увеличение продукции активных форм кислорода и нарушение фагоцитоза, связанного с дисфункцией системы комплемента. В совокупности эти изменения способствуют проникновению возбудителя и развитию инфекции [107; с.382-401]. Ретроспективное клиническое исследование показало, что соотношение лимфоцитов к нейтрофилам, тромбоцитам и моноцитам может предсказать необходимость выполнения ампутации у больных СДС [84; с.118-125].

Иммунная система является основным источником цитокинов. Макрофаги и дендритные клетки могут продуцировать цитокины в ответ на молекулярные эффекты, связанные с повреждением. Эти провоспалительные цитокины ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, интерферон- β и др.) запускают активацию RANKL остеобластами и способствуют остеокластогенезу [150; с.59-84.]. Адапторные митохондриальные противовирусные сигнальные белки (MAVS) также стимулируют инфицированные клетки к секреции цитокинов путем активации путей NF- κ B и IRF3, которые регулируют экспрессию интерферонов типа I. При связывании с его рецепторами, провоспалительные цитокины ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6) активируют путь JAK-STAT. Вследствие этого, происходит ингибирование репликации патогенов. Интерфероны типа I, такие как INF- β , экспрессируются в стромальных клетках, которые могут дифференцироваться в зрелые остеобласты [150; с.59-84, 97; с.1040-1049, 135; с.1137-1139].

Исходя из вышеизложенного, сочетание диабетической невропатии, недостаточности перфузии, нарушения функции эндотелия, дисфункции нейтрофилов и дисбаланса цитокинов способствует развитию и прогрессированию инфекции, формированию ишемических язв или гангрены и может привести к ампутации конечности [175; с.19-25]. Чтобы избежать ампутации и прогрессирования заболевания, необходимо лучше понять место

каждого патогена в генезе СДС у больных сахарным диабетом [13; с.139–143].

На уровень активности биологически активных веществ большое влияние оказывает уровень экспрессии генов, кодирующих их продукцию [47; с.29-38]. Пациенты с макро- и микрососудистыми осложнениями СД отличаются от общей популяции частотой сочетания генотипов воспалительных цитокинов и факторов роста сосудов. научные исследования показали [155; с.29-34, 36; с.34-42, 47; с.29-38].

Однако, эти работы немногочисленные и не рассматривают взаимосвязь частот аллельного и генотипического полиморфизмов с клиническими формами СДС. Это определяет повышенный интерес к проведению широкомасштабных научных исследований по изучению роли генетических полиморфизмов в изменении продукции сосудистых факторов роста и цитокинов - регуляторов процессов ангиогенеза и воспаления, при синдроме диабетической стопы у больных с сахарным диабетом [127; с.106-131, 11; с. 26–30, 36; с.34–42, 47; с.29–38].

§ 1.3. ВЛИЯНИЕ И РОЛЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ (IL-6, TNF - A) И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (VEGFA) В ПАТОГЕНЕЗЕ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

СДС - одно из самых распространенных осложнений сахарного диабета, встречающееся в 30-80% случаев [159; с.936-942, 173; с.153-174]. По данным статистики, в среднем на 10 000 населения регистрируется 668,4 случая заболевания СДС [15; с.170-177, 16; с.63-83.].

Социальное значение СДС заключается в том, что развитие абсцессно-гангренозного процесса у данной группы пациентов приводит к увеличению частоты ампутаций различного уровня, приводящих к стойкой инвалидности и ее последствиям. Частота гангрены на фоне этого состояния колеблется от 7 до 11 случаев, а смертность составляет 20-30% [176; с. 917, 125; с.355-359.]. Важно отметить, что стоимость лечения больных с СДС очень велика. По

литературным данным, только прямые затраты на проведение амбулаторного и стационарного лечения в 2017 году составили около 16 920 долларов США.

Диагностика синдрома диабетической стопы на доклинической стадии является актуальной проблемой современной медицины. Все имеющиеся в настоящее время методы направлены на выявление имеющихся поражений стопы по специфическим кожным, неврологическим, сосудистым и скелетным поражениям [172; с.515, 154; с.148-154]. Однако диагностика синдрома диабетической стопы остается сложной на доклинической стадии [159; pp.936-942], а понимание геномных ассоциаций многофакторных заболеваний, таких как СД, имеет фундаментальное значение для более широких медицинских исследований, направленных на раскрытие природы этой группы заболеваний. Поскольку отдельные генетические факторы редко играют роль в патогенезе заболевания, особенно важна комплексная оценка комбинации генетических полиморфизмов[50; pp.18-26].

Недавние исследования показали, что пациенты с диабетом 2 типа отличаются от общей популяции по частоте комбинаций генотипов воспалительных цитокинов и факторов роста. Для повышения прогностической ценности генетических признаков необходимо изучить комбинацию генов, связанных с патогенезом МДД. Этот подход все чаще используется для изучения генетической основы многофакторных заболеваний человека, включая МДД и его осложнения [50; с. 18-26]. Хроническое системное воспаление и дисрегуляция ангиогенеза считаются преобладающими механизмами сосудистых осложнений диабета [136; с. 23].

1.3.1. Значение хронического воспаления и ассоциации полиморфных локусов генов цитокинов (IL-6 и TNF - α) в патогенезе синдрома диабетической стопы

СДС у больных сахарным диабетом, осложненный гнойно-некротическими осложнениями, является изнурительным заболеванием, которое возникает из-за хронического воспаления, препятствующего процессу заживления тканей. СДС увеличивают заболеваемость и смертность

у больных сахарным диабетом [130; с.35-47]. Частота появления СДС в течение жизни у больных сахарным диабетом оценивается в 15-25%, а частота рецидивов у предшествующих пациентов составляет 30-40%. При наличии диабетических трофических язв могут развиваться тяжелые инфекции, которые в конечном итоге приведут к ампутации конечности [168; с.50-59, 169; с.50-61]. Примерно в 85% случаев ампутациям у больных сахарным диабетом предшествуют диабетические трофические язвы стоп [125; с.355-359]. Большие ампутации конечностей резко снижали 5-летнюю выживаемость до 8,3% [177]. Несмотря на прогресс в лечении СДС, существует риск необходимости выполнения ампутации нижних конечностей с распространенностью 8,8% во всем мире, при этом более 50% ампутаций ног в США выполняются в связи с СДС [92; с.1808-1817].

Хроническое воспаление является одним из компонентов патогенетических процессов при СД. Его основным проявлением является хроническое вялотекущее воспалительное состояние, называемое "поствоспалительным процессом". У пациентов с СД повышены уровни таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и МСР-1, причем их экспрессия увеличена одновременно и в моноцитах и в макрофагах [96; с. 62-75]. Ожирение является фактором риска развития СД2, а ожирение наряду с диабетом усугубляет его, вызывая хроническое воспаление [157; с. 681-690, 164; с.527-538]. Гипертрофия и гиперплазия жировой ткани приводят к увеличению секреции лептинов и воспалительных цитокинов, включая интерлейкин ИЛ6, ИЛ1 и фактор некроза опухоли (TNF- α), из адипоцитов с одновременным снижением уровня адипонектина. Секретируемые цитокины индуцируют рекрутирование воспалительных иммунных клеток, которые секретируют хемокины, и дополнительно усиливают выработку иммунных клеток [130; с.35-47]. Эти изменения вызывают воспаление при СД. Разрешение воспалительной фазы является активным процессом, который включает устранение провоспалительных сигналов и возвращение к гомеостазу [158; с.343-365]. Диабетическая

микроангиопатия и аномальный ответ на гипоксию при СД вызывают связанную с гипоксией гибель клеток и повышенную секрецию хемоаттрактантного белка-1 моноцитов, хемокинов из кератиноцитов и IL-6, IL-1 и TNF- α из инфильтрирующих иммунных клеток. Активированные фибробласты, приобретающие фенотип миофибробластов, однако персистирующее воспаление и измененная функция фибробластов ухудшают заживление ран из-за ослабления ангиогенеза и нарушения образования грануляционной ткани [80; с.6270]. Происходит нарушение цитоскелетных белков кератина (K2, K6 и K10), что препятствует развитию кератиноцитов и отрицательно влияет на реэпителизацию [126; с.37-43]. Кроме того, связанный с диабетом атеросклероз и снижение ангиогенеза и ревазуляризации приводят к уменьшению поступления питательных веществ и кислорода к месту раны [58; с.82-91]. Эпидемиологические исследования продемонстрировали корреляцию между хроническим воспалением, ассоциированным с СД, и наличием многочисленных воспалительных биомаркеров. При длительной гипергликемии жировая ткань будет повышать резистентность к инсулину за счет воспалительных механизмов, таких как высвобождение свободных жирных кислот и нарушение регуляции адипокинов. Воспаление можно распознать по увеличению циркулирующих провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-8, TNF- α . [96; с.6275, 156; с.26-57]. Разработка новых методик прогнозирования риска возникновения и прогрессирования хронического воспаления при СД предложит новое направление для лечения СДС, а так же послужит улучшению качества жизни и снижению экономической нагрузки на пациентов с СД [157; с.681-690]. При диабете процесс заживления останавливается на фазе воспаления, задерживается и связан со снижением регенерации тканей. Провоспалительные цитокины, включая IL-6, IL-8, IL-1 и TNF- α , способствуют инфильтрации язвы Т-клетками CD8, нейтрофилами и макрофагами. Постоянно повышенная инфильтрация иммунных клеток и секреция провоспалительных цитокинов, характерны для СДС [130; с.35-47].

В последнее время работы многих ученых посвящены изучению участия генов цитокинового каскада в развитии сосудистых осложнений СД [42; с.166-171, 86; с.62-67, 90; с.27-31]. Воспаление является одним из основных патофизиологических субстратов повреждения сосудов при сердечно-сосудистых заболеваниях. Увеличенная выработка эндотелиальных медиаторов воспаления является патогенетической основой повреждения сосудистой стенки [125; с. 355-359].

В Узбекистане был выполнен ряд работ, которые были посвящены изучению роли воспаления и экспрессии цитокинов в патологических процессах, протекающих при СД и его сосудистых осложнениях, в том числе и СДС [117; с.473-478, 146; с.1518-1523, 123; с.135-139, 24; с.20–22]. Однако, в них не были рассмотрены вопросы роли генетических полиморфизмов генов, кодирующих экспрессию цитокинов у больных с СДС.

Хотя общее понимание роли генетических факторов в этиологии сосудистых осложнений СД установлено, вклад конкретных генов в патогенез СДС остается неясным.

Исследование генетической основы СДС открывает перспективы для разработки эффективных методов профилактики, соответствующего лечения и методов прогнозирования влияния различных факторов окружающей среды на прогрессирование заболевания [104; с.1140–1153].

Ген IL-6 кодирует выработку цитокина, воздействующего на процессы воспаления и созревание В-клеток. Функция этого гена связана с различными заболеваниями, в основе которых лежат процессы воспаления⁵. Интерлейкин-6 (IL-6) - важный воспалительный цитокин, участвующий в патогенезе сахарного диабета 2 типа (СД), дисрегуляция сигнала пути IL-6 была вовлечена в этиологию аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая СД [59; с.685-698]. Одним из наиболее часто анализируемых

⁵ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>

полиморфизмов гена IL-6 является rs1800795, однако его роль в патогенезе СД остается до настоящего времени дискуссионной: в 2015 году Dhamodharan U. и соавторы [86; с.62-67] сообщили, что в индийской популяции был исследован однонуклеотидный полиморфизм rs1800795 гена IL-6 и сообщили о возможной его ассоциации с предрасположенностью к СДС. Результаты показали, что аллель С полиморфизма rs1800795 гена IL-6 обеспечивает значительную защиту от СД, но не от СДС. Аналогичные результаты были обнаружены в турецкой популяции в исследовании Erdogan M. и соавторов [90; с.27-31] Аллель G полиморфизма rs1800795 гена IL-6 наблюдалась как фактор риска СД, но не была независимым фактором возможного возникновения СДС. В 2018 году Viswanathan V. И соавторы [174; с.1995-2000] обнаружили, что носители мутантных генотипов CC и CG полиморфизма rs1800795 гена IL-6, по сравнению с больными с генотипом GG данного однонуклеотидного полиморфизма, были более восприимчивы к *Staphylococcus spp*, *Proteus morgani* и *Citrobacter diversus* и, как сообщалось, были ассоциированы с повышенной восприимчивостью к *Citrobacter diversus*. Также было обнаружено, что у пациентов с генотипами GC и CC серологический уровень цитокина IL-6 был значительно ниже, чем у пациентов с генотипом GG. Эти данные позволяют предположить, что полиморфизм rs1800795 в гене IL-6 вовлечен в развитие тяжелых раневых инфекций у пациентов с СДС, отчасти из-за его влияния на уровень IL-6 в сыворотке крови. Однако в своем исследовании авторы генотипировали полиморфизм rs1800795 гена IL-6 из раневой жидкости пациентов с СДС и изучили его ассоциацию с уровнем цитокина IL-6 в сыворотке крови. В 2020 году Cui J. и соавторы [79; с.40] провели метаанализ который был посвящен потенциальной ассоциации между полиморфизмом rs1800795 гена IL-6 и риском микрососудистых осложнений у пациентов, страдающих СД. На основании проведенного анализа 14 научных работ, посвященных исследованиям генетических полиморфизмов при СДС, авторы пришли к выводу, что этот однонуклеотидный полиморфизм не связан с

предрасположенностью к микрососудистым осложнениям при СД. Однако, данное исследование [79; с.40] включало все микрососудистые осложнения СД (диабетическая нефропатия, ретинопатия и подиатрия) и различные этнические группы, эти параметры были синтезированы и проанализированы в целом, что может привести к высокой гетерогенности. Поэтому существует повышенный риск систематической ошибки в результатах [103; с.1140-1153].

Так же заслуживают интереса, работы посвященные исследованию роли однонуклеотидных генетических полиморфизмов гена цитокина TNF- α в формировании СДС.

Ген TNF- α кодирует многофункциональный провоспалительный цитокин, принадлежащий к суперсемейству фактора некроза опухоли TNF- α . Провоспалительный цитокин TNF- α в основном секретируется макрофагами, он связывается с рецепторами TNFRSF1A/TNFR1 и TNFRSF1B/TNFR2, осуществляя таким образом свои функции. Этот цитокин участвует в регуляции ряда биологических процессов, таких как клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, липидный обмен и коагуляцию. Как часть гуморального иммунитета к инфекции, фактор некроза опухоли- α (TNF- α) участвует в воспалительных реакциях и играет важную роль в этиологии многих патологических состояний, таких как инсулинорезистентность, псориаз, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, туберкулез, аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек, рак и как диабет⁶. Являясь одним из наиболее известных представителей семейства цитокинов TNF, TNF- α секретируется в основном макрофагами, Т-киллерами, лимфоцитами. В последние годы появляется все больше доказательств того, что однонуклеотидные полиморфизмы в гене TNF- α связаны с развитием различных воспалительных заболеваний, включая хронический остеомиелит [101; с.395-401], COVID-19 [94; с.133-139] и тяжелый сепсис [105; с.409-420]. Недавно проведенные научные

⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>

изыскания также показали, что однонуклеотидные полиморфизмы в гене TNF- α (в основном rs1800629 и rs361525) связаны с формированием и прогрессией СД. Так в исследовании, опубликованном в 2015 году Dhamodharan U. и соавторы [86; с.62-67] обнаружили, что в дополнение к однонуклеотидному полиморфизму гена IL-6, генетический полиморфизм гена TNF- α rs1800629 (но не rs361525) способствует повышению риска развития СДС у больных сахарным диабетом. В 2018 году та же группа [174; с.1995-2000] обнаружила, что полиморфизмы rs1800629 и rs361525 гена TNF- α также связаны с тяжелыми развитием тяжелых микробных инфекций у больных с СДС. В частности, генотипы GA и AA полиморфизма rs1800629 гена TNF- α , как оказалось, повышают восприимчивость к инфекциям, связанным со *Staphylococcus* sp. Генотипы GA и AA полиморфизма rs361525 гена показали повышенный риск инфекций, связанных с *Proteus morgani* и *Enterococcus* sp. Кроме того, однонуклеотидные полиморфизмы rs1800629 и rs361525 гена TNF- α продемонстрировали выраженную ассоциацию со степенью тяжести СД. Также было исследовано возможное влияние этих генотипических полиморфизмов гена TNF- α на серологические уровни биомаркеров воспаления. Авторы отметили, что у пациентов с генотипами GA и AA rs1800629 полиморфизма гена TNF- α уровни TNF- α и hsCRP в крови были значительно ниже по сравнению с пациентами с генотипом GG [174; с.1995-2000].

Однако, эти результаты были получены в ходе двух исследований, сфокусированных на одной популяции и проведенных одной исследовательской группой, желательное проведение будущих исследований в различных популяциях и этнических группах. Исходя из этого идентификация однонуклеотидных полиморфизмов генов цитокинов IL6 и TNF- α у пациентов с синдромом диабетической стопы поможет выявить лиц с высоким риском, которые нуждаются в более качественном лечении, заблаговременно, до появления у них первых симптомов СДС, связанных с хроническим воспалением.

Современные представления о значении нарушения процесса ангиогенеза и мутациях гена сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFA) в формирование синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом. СДС – это тяжелое заболевание, являющееся одним из грозных осложнений у больных с СД [82; с.28-42, 116; с.194-196]. СДС характеризуется триадой: нейропатией, ишемией и развитием инфекционного процесса. Формирование СДС имеет тесную связь с периферической невропатией, травмами и заболеваниями периферических сосудов [181;с.18-24]. Несмотря на все достижения современной медицинской науки (улучшение инсулинов, появление более эффективных антибиотиков, появление современных ангиопротективных препаратов, развитие эндоваскулярной хирургии), количество пациентов с диабетическими поражениями конечностей, которым требуется выполнение дальнейших ампутаций нижних конечностей продолжает расти. Около 15-20% пациентов с СДС нуждаются в проведении ампутаций нижних конечностей [8; с.11-15]. Это является наиболее тревожными поздними осложнениями сахарного диабета из-за ухудшения качества жизни, связанного с ампутацией. Нарушение процесса ангиогенеза приводит к развитию длительного текущих гнойно-некротических процессов, которые являются наиболее частыми осложнениями СДС [127; с.10672]. Улучшение процесса ангиогенеза при синдроме диабетической стопы связано с ускорением заживления ран [32; с.24].

Ангиогенез - это пролиферация эндотелиальных клеток (ЭК) из состава стенки сосуда и образование новых капилляров из существующих сосудов. Процесс ангиогенеза проходит несколько стадий благодаря взаимодействию компонентов клеточного матрикса, растворимых факторов и клеток [191; с.133-140].

Гипоксия (гипоксия или ишемия) является пусковым механизмом ангиогенеза, приводя к транскрипции гипоксия-индуцибельного фактора-1 α

(HIF-1 α), который активирует фактор роста эндотелия сосудов (VEGFA) и его рецепторы (VEGFR1 и VEGFR2) [26; с.26].

Ангиогенез играет важную роль в процессах репарации при СДС. Заживление раневых дефектов начинается, когда ткань повреждена, и весь процесс может занять недели, месяцы или даже годы. В процессе заживления ран выделяют четыре стадии: гемостаз, воспаление, пролиферацию тканей и ремоделирование [33; с.559-567]. Нейтрофилы, моноциты/макрофаги и лимфоциты участвуют в воспалительной фазе. Эти клетки мигрируют из кровотока в ответ на хемоаттрактанты, высвобождаемые поврежденными тканями и другими воспалительными клетками [91; с.775–785]. Заключительные этапы заживления ран состоят из ремоделирования коллагена, превращения фибробластов в миофибробласты и реорганизации внеклеточного матрикса. Сосудистое ремоделирование поврежденной ткани является важнейшим этапом заживления путем восстановления нормального кровообращения [91; с.775-785].

Физиологический ангиогенез представляет собой динамический процесс, регулируемый многими факторами, при этом поддерживается тонкий баланс между стимуляторами и ингибиторами. Нормально протекающий ангиогенез требует взаимодействия всех цитокинов, интегринов и рецепторных белков [33; с.559-567]. Это связано с тем, что дефицит, избыток или нарушение любого из компонентов этого процесса может способствовать развитию аномального ангиогенеза. Аномальный ангиогенез и связанное с этим нарушение заживления ран наблюдаются у пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС) [47; с.29–38, 127; с.10672].

Гипергликемия является ингибитором ангиогенеза и маркером риска развития диабетической ангиопатии. При СДС повреждение эндотелия сосудов напрямую вызывает нарушение ангиогенеза, которое происходит в начале стадии пролиферации [162; с.57-68]. В многокомпонентный процесс ангиогенеза вовлечено множество цитокинов и факторов роста, наиболее

важными из которых являются сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGFA) [100; с. 323, 32; с. 24].

Сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGFA) представляют собой семейство структурно сходных белков, которые вместе со своими рецепторами (VEGFR) играют важную роль в регуляции развития и активности кровеносных и лимфатических сосудов. С момента открытия VEGFA считалось, что он является только стимулятором ангиогенеза [140; с.424, 129; с. 10959, 47; с.29–38]. Однако, по мере накопления информации, стали ясны его роль и в нейропротекции клеточных элементов периферической системы [137; с.285-291, 180; с.323, 71; с.337]. VEGFA участвует в процессе ангиогенеза, стабилизируя новообразованные кровеносные сосуды. Он напрямую стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. В основном фактор роста эндотелия сосудов участвует в ранних стадиях ангиогенеза (активации образования кровеносных сосудов) [47; с.29–38, 155; с. 29-34].

Развивающаяся при СД гипоксия индуцирует фактор-1 (HIF-1), который представляет собой фактор транскрипции, регулирующий в свою очередь экспрессию VEGF. Нейроишемическое повреждение тканей при СДС уменьшает в них концентрацию кислорода и питательных веществ, разрушает клеточные структуры, вызывая повреждение и гибель таких клеток как макрофаги, кератиноциты, тучные клетки и фибробласты, которые содействуют выработке факторов роста эндотелия сосудов. VEGFA играет роль в заживлении ран, особенно на воспалительной и пролиферативной стадиях, участвуя в восстановительном ангиогенезе [147; с. 1035-1048, 195; с.1–11, 114; с.59].

Сосудистый эндотелиальный фактор роста продуцируется различными клетками, включая эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки, кератиноциты и макрофаги, и его действие опосредованно в основном через специфические рецепторы, такие как VEGF-R1 и VEGF-R2. [124; с.109-112]. В настоящее время известно, что экспрессия активированных VEGFAs

увеличивается в ответ на гипоксию; этот процесс широко изучается при многих сосудистых заболеваниях, включая артериальную гипертензию, ишемическую болезнь сердца, ишемический инсульт и онкологическую патологию [29; pp 234-239, 34; 8-17]. Однако, его роль в патогенезе СДС изучена не достаточно [52; с. 134-139]. Пациенты с диабетом представляют собой особую группу в связи с возникновением макрососудистых и микрососудистых осложнений: васкулопатия при диабете 2 типа (СД2) является основной причиной тяжелой нефропатии, диабетической ретинопатии и диабетической микроангиопатии нижних конечностей. Эти клинические проявления нарушенного ангиогенеза являются важной причиной инвалидности и смерти пациентов с СД2 [155; с. 29-34]. Ишемия приводит к перепроизводству многих биологических веществ, среди которых матриксные металлопротеиназы (ММП) сильно индуцируют выработку фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), стромального фактора роста-1 (SDF-1) и пигментного эпителиального фактора роста (PEDF), баланс которых определяет состояние сосудистого русла в ткани [13; с. 139 - 143]. Роль фактора роста эндотелия сосудов в патогенезе диабетической ретинопатии и нефропатии была предметом многочисленных исследований [166; с. 15 - 22, 106, 17; с. 471 - 477, 21; с. 919 - 923].

Следует отметить, что диабетическая ретинопатия характеризуется патологически избыточным ангиогенезом с повышенным уровнем экспрессии VEGFA [21; с.41–49]. С другой стороны, у больных с синдромом диабетической стопы наблюдается нарушение процесса заживления ран, вследствие дефицита VEGFA. Это происходит в результате нарушения ангиогенного процесса [147; с.1035-1048].

В научной литературе мало информации о значении и изменениях уровней VEGFA у пациентов с СДС, имеются единичные исследования, проведенные в этом направлении [128; с.10959]. Было выявлено, что на ранней стадии патологического процесса отмечается тенденция к увеличению содержания VEGFA в сыворотке, которое достигает максимума

в стадии развернутой клинической симптоматики, что может отражать проявление компенсаторных процессов, направленных на улучшение ангиогенеза. При этом выраженность патологического процесса коррелирует с количественным содержанием васкулоэндотелиального фактора роста и его рецептора и зависит от длительности сахарного диабета [52; с.134-139].

В настоящее время известно множество регуляторных процессов, лежащих в основе нормального ангиогенеза, и современные молекулярно-генетические подходы могут быть использованы для осознанного и систематического изучения генов, вовлеченных в этот процесс у пациентов с инцидентальным СКД [194; с. 16-23]. Известны однонуклеотидные изменения в промоторных областях генов VEGF-A, VEGF-B и VEGF-C, влияющие на уровень продукции белка: Аллели -2578C, -1154G и -634C связаны с высоким уровнем экспрессии VEGF-A. Однонуклеотидные полиморфизмы в позициях -2578 и -1154 в промоторной области VEGFA влияют на синтез VEGFA стимулированными периферическими моноцитами [51; с. 134-136]. Генотип VEGF-634CC связан с более высокими концентрациями VEGF в сыворотке крови и стимулированной липополисахаридом продукцией VEGF моноцитами у здоровых людей по сравнению с генотипами CG и GG [49; с. 549-557]. Также было установлено, что полиморфизм в позиции +936 в 3' трансляционной области гена влияет на концентрацию VEGF в плазме крови, а у носителей генотипа VEGF+936 T концентрация VEGF в плазме крови снижена [36; с. 34-43].

В ряде исследований изучалась роль генетических полиморфных вариаций генов эндотелиального фактора роста в этиологии СДС у этнически разных пациентов с сахарным диабетом. В 2011 году Amoli M.M., et al. [63; с. 215-219] опубликовали данные об изучение ассоциации генов-кандидатов полиморфизма гена VEGFA C2578A с риском развития СДС среди населения Ирана. В кросс исследование принимали участие пациенты с сахарным диабетом 2 типа, с сопутствующим СДС. Результаты исследования показали, что частота генотипа AA была значительно снижена у пациентов с

СДС по сравнению с контрольной группой (AA против CA + CC, $p = 0,003$, OR = 0,44, DI = 0,24–0,80). Также наблюдалось достоверное снижение частоты аллеля А у пациентов с СДС по сравнению с контролем ($p = 0,02$, OR = 0,68, DI = 0,48–0,96). Таким образом было показано, что более низкая частота аллеля А у пациентов с СДС оказывает защитный эффект, который может быть результатом повышенного ангиогенеза у пациентов, несущих этот аллель.

В исследовании проведенном Li X.et al. [127; с.10672] была изучена связь полиморфизмов rs699947 и rs13207351 гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) с предрасположенностью к СДС у 89 больных сахарным диабетом, осложненным СДС, являвшихся представителями китайской популяции хань. Было установлено, что представители китайской популяции хань, несущие аллель VEGF rs699947A, имели низкую восприимчивость к СДС.

Масштабное Case-control исследование, посвященном изучению генотипических полиморфизмов 405C > G и 460 C>T гена VEGFA у больных СДС, было проведено в Индонезии Dahlan K.M. и соавторами в 2019 году [81; с.1246]. Его результаты показали что, генотип GG VEGF G405C не имеет значимой ассоциации с СДС у больных СД (GG + CG/CC, OR - 0,52, 95% CI, 0,15–1,73 $p=0,289$). Аллель G предполагается в качестве защитного фактора при СДС (OR-0,86, 95% CI, 0,57-1,28 и $p= 0,456$). Генотип TT по гену VEGF T460C не имеет значимой связи с СДС (TT + CT / CC, OR - 0,97, 95% CI, 0,41 - 2,26: $p= 0.942$). Аллель T предсказывается как защитный фактор при СДС (OR-0,90, 95% CI, 0,59 - 1,37 and $p =0,641$). Авторами был сделан вывод, что аллели G и аллели T гена VEGFA прогнозируются как протективный фактор у больных СД, ассоциированным с СДС.

Различными авторами приводятся противоречивые сведения об ассоциативной связи различных полиморфизмов генов VEGFA с формированием синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом. Так в научной работе, выполненной Русановым А.В. и соавт., и

посвященной изучению ассоциации между полиморфизмом С936Т гена VEGFA и развитием синдрома диабетической стопы в украинской популяции, было показано отсутствие взаимосвязи между изучаемым генотипом полиморфизма гена VEGFA и развитием СДС [36; с. 34-42].

Таким образом, в последнее время удалось достичь больших успехов в изучении и понимании генетических механизмов ангиогенеза и его роли в патогенезе СДС. Определенна, в целом, роль генетических полиморфизмов эндотелиального фактора роста VEGFA в возникновении болезни. Однако рассмотренные литературные данные противоречивые и не дают конкретного представления об ассоциации различных полиморфных локусов гена VEGFA с развитием синдрома диабетической стопы.

Исходя из вышеизложенного, для персонализации прогноза риска возникновения СДС и проведения целенаправленных лечебных мероприятий при его возникновении, необходимо исследовать генетические комбинации полиморфизмов генов цитокинов и факторов роста, регулирующих воспаление и ангиогенез при СДС. Следовательно, изучение генетических факторов риска развития СДС не потеряло своей актуальности.

РЕЗЮМЕ

Исследований, посвящённых изучению наследственной предрасположенности к развитию синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом очень мало. Это, в основном, обусловлено наличием небольшой информативной базы, недостаточным обследованием больных, отсутствием координации различных специальностей в ведении этой категории больных. Исследование молекулярно – генетического патогенеза СДС позволит значительно повысить точность его диагностики. Следует отметить, что ранняя и достоверная диагностика предрасположенности к заболеванию, его возможным осложнениям во многом предопределяет не только прогноз, но и возможный исход этой патологии. Своевременное выявление факторов риска развития СДС даст возможность выделить группу

больных, которые нуждаются в постоянном наблюдении и проведении профилактических мероприятий.

До настоящего времени мало изучены прогностические критерии для этих больных, что требует дальнейшего проведения молекулярно-генетических исследований для оценки роли различных лабораторных и генетических показателей как факторов диагностики и риска развития СДС. Полученные данные исследований будут способствовать значительному совершенствованию оценки диагностической и прогностической роли выявления генетических мутаций при СДС, что позволит проводить полноценную оценку индивидуального прогноза и разработать план лечения с учётом индивидуальных особенностей каждого пациента и стадии СДС.

Учитывая важное значение молекулярно-генетических исследований для достоверной постановки диагноза заболевания, данное исследование посвящено изучению роли генетических полиморфизмов генов провоспалительных цитокинов IL6 и TNF- α и сосудистого фактора роста эндотелия сосудов VEGFA в патогенезе СДС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ.

§2.1. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ГРУПП

Нами с 2020 по 2022 гг. было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 96 больных, обратившихся на обследование и дальнейшее лечение в клиники Андижанского Государственного медицинского института (клиники АГМИ) и Андижанский областной диспансер эндокринологических заболеваний (АОДЭЗ).

Были проанализированы данные первичного выявления синдрома диабетической стопы у 96 пациентов, проведённые в ходе выполнения исследовательской работы в клиники АГМИ и АОДЭЗ.

Критериями включения в наше исследование являлось

1. Больные сахарным диабетом 2 типа с симптомами сформированного СДС.
2. Мужчины и женщины в возрасте от 35 лет и старше.
3. Согласие больного.

Критериями невключения являлось.

1. Больные сахарным диабетом 1 типа.
2. Наличие гепатита, цирроза печени.
3. Тяжелая патология сердечно-сосудистой системы: инфаркт миокарда в последние 6 месяцев, нестабильная стенокардия, некомпенсированная сердечная недостаточность
4. Декомпенсированные нарушения функций печени и почек
5. Беременность и кормление грудью.

Диагноз выставляли на основании клинических данных и результатов лабораторных, инструментальных и генетических исследований. При установлении диагноза СДС придерживались диагностических критериев

предложенных Консенсусом по диабетической стопе International Diabetic Foot Study Group [45; с.41-47]:

1. Нейропатическая форма: характеризуется длительным анамнезом диабета, другими поздними осложнениями диабета, отсутствием болевого синдрома, нормальным цветом и температурой кожи, сохранением артериального пульса на ногах и снижением периферической чувствительности всех видов.
2. Нейроишемическая форма: характеризуется выраженным болевым синдромом, бледностью, снижением температуры кожи, внезапно ослабленным пульсом на артериях ног и сохраненной чувствительностью

Для оценки тяжести трофических и гнойно-некротических осложнений у больных СДС мы применили шкалу, предложенную Wagner F.W. [35; с.26]:

1. Отсутствие некротического дефекта кожи.
2. Поверхностный некротический дефект.
3. Язвенный дефект, дном которого является подкожно-жировая клетчатка, сухожилия, капсула сустава.
4. Язвенный дефект с вовлечением костных структур, полости суставов
5. Ограниченная гангрена (пальцы, пятка или гангрена до трансметатарзального уровня).
6. Распространенная гангрена

У всех исследованных нами пациентов был сахарный диабет 2 типа, 52 из них получали различные виды инсулинов, а 44 - пероральные препараты для лечения диабета. Продолжительность диабета у исследуемых пациентов представлена в таблице 2.4. У всех пациентов в качестве симптома СДС имелись язвенные поражения кожи и мягких тканей (трофические язвы) стоп, которые продолжались более 6 недель. Всем больным с нейроишемической формой СДС были произведены оперативные вмешательства различного объема (этапные некрэктомии, экзартикуляции, большие и малые ампутации конечности).

Решение цели и задач нашего исследования выполнены в следующей последовательности. На самом начале обращения больных на обследование проводился тщательный осмотр, сбор клинико-anamnestических данных, изучение результатов лабораторно-инструментальных исследований, показателей биохимического анализ крови (уровень HbA1c, уровень сахара крови, лейкоцитов в периферической крови, показатели коагулограммы), наличия клинической симптоматики (костные, трофические изменения стоп), инструментальные методы исследования – ультрозвуковая доплерография сосудов конечностей. Для выявления диабетической микро-и макроангиопатии пациентам проводились неврологический и сосудистый скрининги

Затем во всех этих подгруппах больных была оценена длительность и характеристика течения заболевания. Были изучены частоты выявления однонуклеотидных полиморфизмов генов цитокинов, интерлейкина 6 IL6 C174G, фактора некроза опухоли – а TNF - G308A, а так же мутационный спектр гена эндотелиального фактора роста сосудов VEGFA G634C и их влияние на вероятный шанс формирования и прогрессирования СДС. Установлены диагностические значения генетических нарушений в развитии заболевания. В заключении провели обобщение и интерпретацию результатов проведённых исследований. На основании этого были выделены наиболее важные клинико-лабораторные данные, установлены основные статистически значимые генетические полиморфизмы, оказывающие влияние на достоверность диагностики синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом и на течение заболевания. Разработан усовершенствованный алгоритм молекулярно-генетической диагностики синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

Было проведено генетическое исследование у 96 больных (мужчин было 64 – 66,7%, женщин 32 – 33,3%) (табл.2.1), которые составили основную группу, из которых были сформулированы 2 подгруппы, отобранных в зависимости от тяжести течения СДС в соответствии с критериями включения и исключения в данное исследование: 1 группа – 36 больных с нейропатической формой СДС (мужчин было 21 – 58,3%,

женщин 15 – 41,7%), 2 группа - 60 больных с нейроишемической формой СДС (мужчин было 43 – 71,6%, женщин 17 – 28,4%). Результаты изучения генетических полиморфизмов исследуемых генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), интерлейкина – 6 (IL6) и фактора некроза опухоли – α (TNF - α) сравнивали с контрольной группой, в которую вошли 83 пробанда, без клинических проявлений сахарного диабета в момент обследования и в анамнезе, которые были представлены пациентами стационара, а также добровольцами, не имеющими у себя и у своих родственников симптомов сахарного диабета.

Табл.2.1

Распределение больных в исследуемой группе.

№	Группа	Пол			
		Мужчины		Женщины	
		п	%	п	%
1	Основная группа n=96	64	66,7%	32	33,3%
1.1	Нейропатическая форма СДС, n=36	21	58,3%	15	41,7%
1.2	Нейроишемическая форма СДС, n=60	43	71,6%	17	28,4%

Согласно классификации возрастов, принятой ВОЗ, придерживались следующих критериев. Молодой возраст 18-44 лет, средний возраст – 45-59 лет, пожилой возраст – 60-74 года, старческий возраст – 75-90 лет, долголетие 90 - + лет. Распределение больных по полу и возрасту в исследуемых группах представлено в таблице 2.2.

Как видно из таблицы, в общей группе пациентов с СДС преобладали лица среднего (22 человек – 22,9%, из них мужчин было 15 – 68,2%, женщин 7 – 31,8%) и пожилого возраста (54 человек – 56,2 %, из них мужчин было 35 – 64,8%, женщин 19 – 35,2%). Среди наблюдавшихся нами больных пациентов в возрасте старше 90 лет не было. Преобладание пациентов этих возрастных групп наблюдалось и во всех исследуемых группах

Таблица 2.2.

Распределение больных по полу и возрасту.

Группы больных	Пол	ВОЗРАСТ					ВСЕГО	
		18-44 лет	45-59 лет	60-74 лет	75-90 лет	Старше 90 лет	N	%
		Нейропатическая форма СДС, n=35	Муж	3	4	12	2	
Жен	2		4	7	1		14	41,7%
Нейроишемическая форма СДС, n=61	Муж	4	11	23	6		44	71,6%
	Жен		3	12	2		17	28,4%
Всего: n=96	Муж	7	15	35	8		65	66,7%
	Жен	2	7	19	3		31	33,3%

Медиана возраста пациентов составила $60,8 \pm 1,2$ лет (табл.2.3). При этом у мужчин она была $60,1 \pm 1,7$, а у женщин $63,3 \pm 1,6$ лет. Средняя возрастная характеристика пациентов с СДС представлена в таблице 2.3. В основной группе средний возраст больных составил $60,8 \pm 1,2$ лет (мужчины $60,1 \pm 1,7$ лет, женщины $63,3 \pm 1,6$ лет).

Таблица 2.3.

Средняя возрастная характеристика пациентов с синдромом диабетической стопы.

Пол	Средний возраст, лет		
	Нейропатическая форма СДС, лет	Нейроишемическая форма СДС, лет	Основная группа больных, лет
Мужчины, лет	$61,8 \pm 2,8$	$60,4 \pm 3,3$	$60,1 \pm 1,7$
Женщины, лет	$59,2 \pm 3,1$	$65,0 \pm 2,6$	$63,3 \pm 1,6$
Все пациенты, лет	$61,1 \pm 2,1$	$61,7 \pm 2,1$	$60,8 \pm 1,2$

В том числе, у пациентов с нейропатической формой СДС медиана возраста составила $61,1 \pm 2,1$ лет (мужчины $61,8 \pm 2,8$ лет, женщины $59,2 \pm 3,1$ лет). У пациентов с нейроишемической формой СДС средний возраст

составил $61,7 \pm 2,1$ лет (мужчины $60,4 \pm 3,3$, женщины $65,0 \pm 2,6$). По возрастному и половому составу исследуемые группы были сопоставимы.

Длительность сахарного диабета типа у пациентов с нейропатической формой СДС был равен $5,7 \pm 1,8$ годам, а пациентов с нейроишемической формой СДС – $7,11 \pm 1,5$ годам.

Таблица 2.4.

Распределение пациентов с СДС по клиничко-анамнестическим характеристикам

Показатель	Нейропатическая форма СДС (n=36)	Нейроишемическая форма СДС (n=60)
Масса тела, кг.	$67,3 \pm 12,1$	$69,5 \pm 10,5$
Стаж диабета, годы	$5,7 \pm 1,8$	$7,1 \pm 1,5$

В группе пациентов с нейроишемической формой СДС преобладали пациенты с тяжелыми формами СДС, у которых наблюдались выраженные трофические и гнойно-некротические поражения стоп. При этом имеется важная особенность в том, что у некоторых пациентов СД дебютировал как трофические и гнойно-некротические осложнения СДС.

У всех исследуемых больных в период обращения на обследование и госпитализацию в стационар были подробно собраны анамнез, результаты лабораторных, молекулярно-генетических и инструментальных методов исследований.

Все исследования в основной группах проводились у больных в возрасте старше 35 лет и с согласия пациента на исследование.

§2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

2.2.1. Клиничко-лабораторные и инструментальные методы.

Все больные, которые мы наблюдали, проходили детальное клиничко-лабораторные обследование.

С целью раннего и точного установления диагноза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом в обязательном порядке проводились следующие исследования:

1. Сбор жалоб и анамнестических данных пациентов.
 - Характер, локализация, длительность болей в нижних конечностях.
 - Наличие отека, гиперемии и время их существования.
 - Длительность существования дефектов мягких тканей (некрозов, ран, язв), их размеры, характер отделяемого, локализация. Длительность течения сахарного диабета и его компенсация.
 - Время манифестации СДС.
 - Наличие травм нижних конечностей.
 - Предшествующие оперативные вмешательства на нижних конечностях, в том числе на сосудах нижних конечностей.
 - Наличие сопутствующих заболеваний, их проявления и степень тяжести.
2. Физикальные методы обследования (оценка проявлений СДС):
 - пульсация на магистральных артериях нижних конечностей.
 - тактильная чувствительность
 - тепловая чувствительность
 - болевая чувствительность
 - глубокая проприоцептивная чувствительность
3. Оценка местного статуса:
 - Состояние кожи Наличие или отсутствие признаков отека, гиперемии, гипо- или гипертермии стопы, рубцов, язв, гнойных затеков или некрозов.
 - Наличие и степень гнойно-некротического поражения стоп по классификации Wagner.
4. Лабораторные исследования:
 - Клинический анализ крови.

- Биохимические исследования крови: уровень общего белка, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, холестерина, креатинина, мочевины в сыворотке крови. Уровень глюкозы крови, гликозилированного гемоглобина
- Определение лейкоцитарного индекса интоксикации.
- Уровень протромбина, фибриногена, активированного частичного
- Общий анализ мочи (наличие глюкозы).

5. Ультразвуковая доплерография артериальных и венозных сосудов конечностей, для оценки нарушения магистрального кровотока.

6. Перкутанное определение напряжения кислорода (ТСрО₂)

Молекулярно-генетические исследования с целью выявления полиморфизма генов – фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), цитокинов интерлейкина – 6 (IL6) и фактора некроза опухоли – α (TNF - α). При оценке местного статуса уделялось особое внимание на местные признаки воспаления: отек, гиперемия, боль при пальпации, наличие индурации по периферии язвы, наличие флюктуации, размер язвенного дефекта, локализацию процесса, степень гнойно-некротического процесса и функциональные нарушения. Если язва расположена вблизи метатарзофалангового сустава, в нижней трети голени или вблизи кровеносных сосудов, симптомы воспаления будут более выраженными.

При проведении клинического анализа крови форменные элементы подсчитывались на анализаторе Medonic, лейкоцитарную формулу определяли в мазках, окрашенных по методу Романовского, скорость оседания эритроцитов анализировали по методике Панченкова.

Лейкоцитарный уровень интоксикации определяли по формуле, предложенной Я.Я.Кальф-Калифом [30; с.73-78].

$$ЛИИ = \frac{(4Ми + 3Ю + 2П + С) (Пл + 1)}{(Мо + Л) (Э + 1)}$$

где Ми - миелоциты, Ю - юные, П - палочкоядерные, С - сегментоядерные, Пл - плазматические клетки, Мо - моноциты, Л - лимфоциты, Э - эозинофилы. В норме у здорового человека ЛИИ составляет 0,5-1,0, при гнойно-воспалительном процессе средней степени тяжести – 2-4, при тяжелой степени – 4-6 и больше.

Биохимические анализы крови проводились фотометрическим методом с использованием биохимического анализатора Mindray по стандартным методикам. Показатель гликозилированного гемоглобина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления в соответствии со стандартным методом производителя. Уровень глюкозы в крови измеряли по цветной реакции с флуоресцеином.

2.2.2 Инструментальные методы исследования.

Дуплексное ультразвуковое исследование сосудов нижних конечностей.

Дуплексное ультразвуковое исследование сосудистой системы нижних конечностей проводилось с помощью ультразвукового аппарата MINDRAY DC-80 X-insight с использованием датчика 8 МГц (PCT 805 AT) по общепринятой стандартной методике в точках, соответствующих проекциям основных сосудистых образований. При этом оценивалось анатомическое и функциональное состояние венозных сосудов (диаметр, толщина стенок) и свойства кровотока. Двойное и тройное ультразвуковое исследование артерий нижних конечностей проводилось для количественной оценки тяжести поражения артерий, наличия стеноза или окклюзии, кровотока и оценки гемодинамических нарушений.

Перкутанное определение напряжения кислорода (ТСрО₂).

Определение перкутанного напряжения кислорода производили с помощью оксимонитора TCM-2 фирмы «Radiometer» (Дания). Во время проведения измерения пациент находился в горизонтальном положении. Фиксация датчика осуществлялась по стандартной технологии,

рекомендуемой фирмой–изготовителем прибора в первом межпальцевом промежутке на тыле стопы [12; с.26]. При наличии трофического поражения, датчик устанавливался на участке кожи стопы с ровной поверхностью, лишенной волос, гиперкератоза и рубцевания. После установки датчика, между кожей и полунепроницаемой мембраной электрода, в камеру самофиксирующегося кольца помещали 3–4 капли контактной жидкости. Показания регистрировались спустя 20 мин. после фиксации датчика Кларка на место измерения.

Парциальное давление кислорода отражает доставку его к коже и, тем самым, объективно характеризует регионарный уровень микроциркуляции и позволяет оценить прогноз заживления раневого дефекта. Известно, что нормальными показателями насыщения тканей раны кислородом является величина - $45,5 \pm 0,5$ мм. рт. ст

Критическим показателем считается уровень $T_{sp}O_2 < 30$ мм рт. ст. (в норме 50–60 мм рт. ст.). В этом случае вероятность заживления язвы крайне низкая [54; с.73].

2.2.3. Генетические методы исследований.

В ходе выполнения данной работы были изучены частоты распределения наиболее важных мутаций генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA), интерлейкина – 6 (IL6) и фактора некроза опухоли – α (TNF - α) (табл. 2.5). Оценена роль и значимость этих генетических мутаций в формировании синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом, а также влияния этих мутаций на особенности течения СДС.

Исследования генетических мутаций проводились в отделении молекулярной медицины и клеточных технологий (руководитель, заслуженный деятель науки РУз, профессор Каримов Х.Я.) и лаборатории медицинской генетики РСНПМЦ гематологии МЗ РУз.

Перечень и функции исследованных генов.

Ген (сокращение)	Функции исследуемых генов
Ген IL6⁷	Ген IL6 локализован на хромосоме 7p15.3, количество экзонов 5. Этот ген кодирует цитокин, который действует при воспалении и созревании В-клеток. Кроме того, было показано, что кодируемый белок является эндогенным пирогеном, способным вызывать лихорадку у людей с аутоиммунными заболеваниями или инфекциями. Белок в основном вырабатывается в местах острого и хронического воспаления, где он секретируется в сыворотку и индуцирует транскрипционный воспалительный ответ через рецептор интерлейкина 6, альфа. Функционирование этого гена связано с широким спектром болезненных состояний, связанных с воспалением, включая подозрение на сахарный диабет.
Ген TNF-α⁸	Ген TNF- α располагается на хромосоме 6p21.33, число экзонов 4. Он кодирует многофункциональный провоспалительный цитокин, принадлежащий к надсемейству фактора некроза опухоли. Этот цитокин в основном секретируется макрофагами. Он может связываться и, таким образом, функционировать через свои рецепторы TNFRSF1A/TNFR1 и TNFRSF1B/TNFR2. Этот цитокин участвует в регуляции широкого спектра биологических процессов, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, метаболизм липидов и коагуляцию.
Ген VEGFA⁹	Этот ген является членом семейства факторов роста PDGF/VEGF. Он находится на хромосоме 6p21.1, имеет 5 экзонов. Ген VEGFA кодирует гепарин-связывающий белок, который существует в виде гомодимера, связанного дисульфидной связью. Этот фактор роста индуцирует про-

⁷ www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569⁸ www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124⁹ www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422

Ген (сокращение)	Функции исследуемых генов
	лиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов и необходим как для физиологического, так и для патологического ангиогенеза. Нарушение этого гена приводит к аномальному формированию кровеносных сосудов эмбриона. Этот ген активируется во многих известных опухолях, и его экспрессия коррелирует со стадией и прогрессированием опухоли.

Данная часть работы состояла из нескольких этапов:

1. Забор периферической крови.
2. Для проведения дальнейших генетических исследований с целью выявления мутаций в генах VEGFA, IL – 6 и TNF - α выделяли геномную ДНК из периферической крови пациентов с применением метода хлороформной экстракции.
3. Проведение ПЦР (RT ПЦР и стандартный ПЦР).
4. Проведение электрофореза и визуализация результатов.

Анализ частоты встречаемости мутаций и полиморфизмов исследуемых генов был проведен с использованием модели по типу «case-control» (случай-контроль, сравнения двух выборок). Выборка «случай» формировалась из 96 пациентов с СДС, обратившихся на обследование и лечение в клиники АГМИ и АОДЭЗ. Для изучения полиморфизма указанных генов после получения согласия на проведение исследования из локтевой вены пациентов производился забор крови в количестве 5 мл. Затем эта кровь помещалась в пробирки типа вакутейнера с ЭДТА в качестве антикоагулянта (1 объём раствора 0,1 MNa₂-ЭДТА, pH 8,0 (20⁰C) + 10 объёмов крови). После чего кровь замораживали при температуре –70⁰C для его хранения. Выделение ДНК из плазмы крови пациентов производилась с применением коммерческого набора «Рибопреп».

В качестве материала для контрольной выборки использованы препараты геномной ДНК, как выделенные самостоятельно, так и хранящиеся в банке ДНК Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра гематологии МЗ РУз.

Генетическое исследование и анализ полученных данных проводился согласно принципам GRIPS с целью повышения прозрачности, качества прогнозирования рисков.

Для изоляции ДНК из плазмы крови применяли комплект реагентов «Ампли Прайм РИБО–преп» («Ampli Sens», Россия). Концентрации выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре Nano Drop 2000 (Nano Drop Technologies, США) при длине волны A260/280нм. Чистота всех образцов выделенного препарата ДНК, определяемая отношением A260/280, составила 1.7/1.8.

Коммерческие стандартные наборы: набор для детекции полиморфизмов G-634C в гене VEGFA , C174G в гене IL – 6, G308A в гене TNF - α фирмы ООО НПФ Синтол (г.Москва).

ПЦР анализ проводили при помощи термоциклеров Applied Biosystems 2720 (США) и CG1-96 («Corbett Research» QUAGEN Германия) и Rotor Gene Q (QUAGEN, Германия) в соответствии со следующими программами амплификации: предварительная денатурация – 94⁰С (3 мин 1 цикл), 40 циклов амплификации: 94⁰С (20 сек) – денатурация, 58⁰С (20 сек), 61⁰С (30 сек) 10 циклов – отжиг праймеров, 94⁰С (20 сек) – денатурация, 58⁰С (20 сек), 61⁰С (30 сек), 30 циклов – элонгация и заключительный синтез 72 ⁰С (10 мин. 1– цикл).

Набор для детекции полиморфизмов фирмы ООО НПФ Литех (г. Москва). ПЦР анализ проводили при помощи термоциклеров Applied Biosystems 2720 (США) и CG1-96 («Corbett Research» QUAGEN Германия) и Rotor Gene Q (QUAGEN Германия) в соответствии со следующими программами амплификации: предварительная денатурация – 93⁰С (1 мин. 1 цикл), 35 циклов амплификации: 93⁰С (10 сек) – денатурация, 60⁰С (10 сек) –

отжиг праймеров, 72⁰С (20 сек) – элонгация и заключительный синтез 72⁰С (10 мин. 1 – цикл). Таким образом, нам удалось успешно провести работу по адаптации используемых олигопраймеров и усовершенствовать методологические подходы детекции полиморфизмов G-634С в гене VEGFA, С174G в гене IL – 6, G308A в гене TNF - α.

Лабораторное оборудование.

Для проведения молекулярно-генетических исследований использовали следующее оборудование: термоциклеры Applied Biosystems 2720 (США) и CG1-96 («Corbett Research» QUAGEN Германия) и Rotor Gene Q (QUAGEN Германия), ламинарный бокс (Германия), центрифуги (Eppendorf, Hittich, Германия), вортекс (Eppendorf, Германия), термостаты, спектрофотометр Nano Drop 2000 «Thermo Scientific» (USA), прибор для горизонтального электрофореза, источник питания (ДНК-Технология, Россия), УФ-трансиллюминатор с встроенной цифровой камерой, автоматические пипетки (Sartorius, Финляндия) и др.

Выделение геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови.

Для экстракции ДНК из лимфоцитов периферической крови применяли модифицированный метод фенольно-хлороформной экстракции и набор «РНК/ДНК-сорб» ООО «Интер Лаб Сервис» (Россия). При заборе крови пациентов были использованы стандартные вакуумные пробирки Vacutainer Becton Dickinson International (США) с ЭДТА.

Детекция ядер лимфоцитов и последующей ДНК проводили в соответствии с методикой, предложенной Sambrook J. (1989) с некоторыми модификациями. Цитратная кровь смешивалась с равным объёмом буфера (4⁰С), содержащего: 0.32М сахарозы, 5ММ MgCl₂, 1% Тритона X-100, 0.01М Tris-HCl рН 7.5. Затем данную смесь центрифугировали на 3000 об/мин при 4⁰С. Ядерный осадок ресуспензировали в 400 мкл буфера для протеиназы К, состава: 10ММ Tris – HCl, рН 10.5, 0.5М NaCl, 1mМ EDTA. Добавляли SDS («Serva», ФРГ) до конечной концентрации 0,5% и инкубировали в присутствии протеиназы К («Serva», ФРГ или «Sigma», USA), с

концентрацией 250 мкг/мл в течение 16 часов при 37°C. К нему добавляли 400 мкл забуференного фенола, с осторожностью перемешивали в течении 10 мин, затем центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин. После этого переносили верхнюю фазу в другую пробирку, к ней добавляли 400 мкл смеси фенол:хлороформа (1:1). Эту смесь перемешивали в течение 5 мин, затем повторно центрифугировали. Извлекали фенол из верхней водной фазы равным объёмом хлороформа. К раствору ДНК добавляли последовательно 40 мкл 3М ацетата натрия и 800 мкл охлажденного 96% этанола. Смесь перемешивали и центрифугировали в течении 15 мин при 14000 об/мин., преципитат промывали 1мл 70% этанола. Центрифугировали повторно, осадок высушивали и растворяли ДНК в ТЕ буфере (10 мМ Tris–HCl pH 7.4, 1мМ EDTA, pH 8.0) в течение 12 часов при комнатной температуре. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре Nano Drop 2000 (США) при длине волны А 260/280 нм. Чистота образцов выделенной ДНК, определяемая отношением А 260/280, составила 1.7/1.8. Это свидетельствует о том, что в растворах выделенной ДНК содержатся очень мало загрязняющих белков или других веществ. Эти растворы являются пригодными для применения в ПЦР без дополнительной их очистки. Раствор геномной ДНК 1 мг/мл, эквивалентный 20 о.е. ДНК, хранили в ТЕ при -20°C.

Полимеразная цепная реакция синтеза ДНК.

Выделение изучаемых локусов проводили с помощью ПЦР с применением термоциклеров Rotor Gene Q (Германия), Gene Amp PCR-system 2720 (Applied Biosystems, США) и CG1-96 («Corbett Research» QUAGEN, Германия).

Для увеличения числа копий ДНК использовали реакционную смесь объёмом 25 мкл, которая содержала 2.5 мкл 1 ОхТaq-буфера (67 мМ трис-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2.5мМ MgCl₂, 0.01% Tween–20), 0.1 мкг геномной ДНК, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого), 1 ед. ДНК-полимеразы *Thermusaquaticus* (производства

фирмы «Силекс», г. Москва) и 5-10 пМлокус специфичных олигонуклеотидных праймеров. После окончания ПЦР специфичность амплификации и количество амплификата проверяли методом электрофореза.

Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле.

Полученные продукты ПЦР разделяли при помощи электрофореза в 1-2% агарозном геле, который содержит бромистый этидий (EtBr). Перед нанесением образец ДНК объемом 10 мкл смешивали с 2 мкл раствора 10% бромфенолового синего. На гель наносили маркер Lader для определения размеров полос ДНК и контрольный образец, представленный мастермиксом без ДНК. После электрофореза гель анализировали при помощи УФ-трансиллюминатора с встроенной камерой.

Растворы для электрофореза: 10X TAE буфер, 242 г Трис основной, 57.1 мл уксусной кислоты, 100 мл 0.5 М EDTA, pH 8.5, H₂O до 1 л, 1%-ный агароза: 0.9 г агароза (SIGMA), 1.2 мл 10X TAE, 6 мкл EtBr, H₂O до 60 мл.

2.2.4. Статистическая обработка и математические методы анализа.

Статистическая обработка полученных результатов исследования выполнена с помощью стандартного пакета прикладных программ Stat Soft Statistica 10.0 (США). Применяли компьютерную программу для анализа генетических данных “Gene Pop” (“Geneticsof Population”), (программа доступна в интернете – <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) проводили оценку отклонения распределений генотипов изученных генетических мутаций ДНК от канонического распределения Харди-Вайнберга.

Расчеты частот аллелей изучаемых генов проводили по следующей формуле: $p = (2np + npq) / 2N$, где N – объем выборки, np – численность гомозигот по аллели p, npq – численность гетерозигот.

Фактическая (наблюдаемая) гетерозиготность:

$$H_{obs} = N_0 / N, \text{ где } N_0 \text{ – численность гетерозигот.}$$

Теоретическая (ожидаемая) гетерозиготность:

$$H_{exp} = 1 - \sum p_i^2, \text{ где } p_i \text{ – частота } i \text{ аллели. } i=1$$

Коэффициент отклонений фактической гетерозиготности от теоретической рассчитывали по следующей формуле:

$$F = (N_{\text{exp}} - N_{\text{obs}}) / N_{\text{exp}}.$$

Для оценки степени различия частоты распределения мутаций, аллелей и генотипов у исследуемых пациентов и контроля пользовались критерием χ^2 Пирсона и отношением шансов (OR) с 95%-ным доверительным интервалом. Для таблиц сопряженности 2×2 применяли критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность, если частота хотя бы в одной ячейке таблицы была меньше или равна 5.

Степень различия частоты распределения мутаций, аллелей и генотипов изучаемых генов оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio (OR) и его 95% доверительного интервала (95% ДИ), по формуле: $OR = (a \times d) / (b \times c)$, где a – частота аллеля (генотипа) в выборке больных, b – частота аллеля (генотипа) в контрольной выборке, c – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке больных, d – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. Значение $OR=1$ показывало отсутствие ассоциации. Значение $OR>1$ рассматривали как фактор повышенного риска, $OR<1$ – как фактор пониженного риска.

Для проведения вычислений результатов исследований применяли пакет прикладных программ «Open Epi 2009, Version 2.3».

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

§3.1.1. Клинические характеристики пациентов с синдромом диабетической стопы.

Настоящая работа основана на данных комплексного клинико-лабораторного и молекулярно-генетического обследования 96 больных синдромом диабетической стопы, отобранных на основании критерий включения в основную группу больных. В ходе исследования пациентов были изучены возрастные характеристики, данные лабораторных исследований крови (уровня HbA1c, сахара крови, лейкоцитов и коагулограммы) и наличие симптомов заболевания (наличия трофических изменений на конечностях, цвет кожных покровов, нарушение болевой и температурной рецепции, костные деформации). У пациентов с СДС изучена частота выявления однонуклеотидных полиморфных генетических маркеров с различным молекулярно-генетическим фенотипом в группах: VEGFAG634C, IL – 6C174G и TNF - α G308A у больных с нейропатической и нейроишемической формами СДС.

В основной группе из 96 больных с СДС нейропатическая форма была выявлена у 35 больных (36,5%), нейроишемическая форма – у 61 пациента (63,5 %).

Симптомы, характерные для СДС и частота их выявления у пациентов с СДС представлены в таблице 3.1.

Достоверных различий по частоте выявленных симптомов у больных с различным молекулярно-генетическим статусом при сравнении данных между всеми группами не выявлено ($p > 0.05$). Вместе с тем установлено, что боли и парестезии обнаруживались относительно чаще других проявлений. Похолодание конечностей отмечалась у пациентов с нейропатической формой СДС – в 63,9%, с нейроишемической формой СДС – в 95,0% случаях. Нарушения чувствительности встречались чаще у больных при

нейропатической формой СДС, чем при наличии нейроишемической формы СДС (91,7% и 15,0% случаях соответственно).

Таблица 3.1.

Клинические симптомы у больных с синдромом диабетической стопы.

Клинические симптомы	Нейропатическая форма СДС n=35	Нейроишемическая форма СДС n=61
Болевой синдром	n=14 38,9%	n=52 86,7%
Парестезии	n=34 94,4%	n=47 78,3%
Похолодание конечностей	n=23 63,9%	n=57 95,0%
Атрофия мышц	n=9 25,0%	n=38 63,3%
Костные деформации	n=27 75,0%	n=29 48,3%
Сохранение пульсации	n=32 89,1%	-
Нарушения чувствительности	n=33 91,7%	n=9 15,0%

Пациенты с невропатической формой СДС предъявляли жалобы на мышечные боли, которая иногда становилась резкой, онемение и ощущение «ползания мурашек», особенно в голенях. Внешне наблюдалась бледность кожи, её сухость, наличие отеков и деформаций стоп. Невропатическая форма СДС характеризуется трофическими язвами на подошвенных и плюсневых поверхностях (69,5% пациентов). Средняя площадь дефекта составила 32,4 см². Дефект располагался на латеральной стороне стопы у 13,5% пациентов, на переднелатеральной стороне у 9,75% и на неопорной части пальца у 3,5%.

Спазм сосудов нижней конечности был уменьшен или полностью отсутствовал. Ограничение диапазона движения и уменьшение боли наблюдались во всех типах.

В проведенном нами исследовании нейроишемическая форма синдрома диабетической стопы встречается преимущественно у мужчин в возрасте 55-60 лет.

Пациенты отмечают в первую очередь сильно выраженный болевой синдром в нижних конечностях. Первоначально боли возникают при ходьбе, по мере прогрессирования заболевания - в виде «перемежающейся хромоты», а при ишемии III степени боли возникают и в покое. Пальпаторно стопы холодные, имеется «мраморность» кожи. У 100% пациентов с данной формой СДС имеются трофические поражения стоп различной степени тяжести.

Полученные данные подтверждают мнение о гетерогенном характере патогенеза СДС как нозологической формы, которая проявляется уже при постановке диагноза, в начале заболевания. Это также подтверждает важность и необходимость исследования молекулярно-генетических маркеров СДС для достоверной диагностики этого заболевания.

§ 3.1.2. Характеристика лабораторных анализов у пациентов с синдромом диабетической стопы.

Данные клинического анализа крови (уровни лейкоцитов, тромбоцитов, фибриногена, ПТИ, гликозированного гемоглобина и ЛИИ) на этапе постановки диагноза СДС представлены в таблице 3.3.

Как видно из таблицы 3.3 количество лейкоцитов и значение ЛИИ у больных с нейропатической формой СДС ($9,6 \pm 0,4$ и $2,9 \pm 0,5$) были ниже, чем у больных с нейроишемической формой СДС ($12,9 \pm 0,8$ и $6,9 \pm 0,3$). Это свидетельствует о наличии процессов хронического воспалительного процесса в обеих группах пациентов, с наибольшей выраженностью у больных с нейроишемической формой СДС.

А количество тромбоцитов было наиболее высоким в группе больных с нейроишемической формой СДС и составило $239,6 \pm 46,7 \times 10^9/\text{л}$, что выше, чем у больных с нейропатической формой СДС.

Таблица 3.3.

Показатели клинического анализа крови больных с СДС.

Показатели клинического анализа крови	Нейропатическая форма СДС n=35	Нейроишемическая форма СДС n=61
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$9,6 \pm 0,4$	$12,9 \pm 0,8$
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$238,4 \pm 41,4$	$239,6 \pm 46,7$
Фибриноген, г/л	$3,7 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,6$
ПТИ, %	$109,3 \pm 2,8$	$114,6 \pm 3,3$
НbA1c, % (0.4.94)	$7,3 \pm 0,9$	$8,8 \pm 1,5$
ЛИИ, усл.ед. %	$2,9 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,3$

Среднее значение гликозированного гемоглобина (НbA1c) у пациентов всех обследованных групп было повышено, причем у больных с нейроишемической формой СДС больше чем у больных с нейротрофической формой СДС ($8,8 \pm 1,5$ и $7,3 \pm 0,9$ соответственно), что свидетельствует о неудовлетворительном контроле за течением заболевания.

§ 3.1.3. Частота встречаемости трофических и гнойно-некротических поражений у больных с СДС.

Для оценки влияния генетических нарушений при СДС на клиническое течение заболевания была изучена частота трофических и гнойно-некротических поражений осложнений.

В ходе данного исследования было обнаружено, что у всех 60 больных с нейроишемической формой СДС были выявлены трофические и гнойно-некротических поражения стоп различной степени тяжести (таб. 3.4). У пациентов с нейропатической формой СДС течение заболевания с трофическими осложнениями было ниже и составило соответственно 47,2%.

Степень тяжести трофических изменений, характерных для нейропатической и нейроишемической форм СДС представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4.

Степень тяжести трофических изменений у больных исследуемой группы по Wagner J.W

Степень	Нейропатическая форма СДС (n=35)	Нейроишемическая форма СДС (n=61)
Степень тяжести трофических изменений по Вагнеру		
0 степень	8 (22,9%)	-
I степень	9 (25,7%)	10 (16,4%)
II степень	7 (20,0%)	11(18,0%)
III степень	11 (31,4%)	17 (27,9%)
IV степень	-	14 (23,0%)
V степень	-	9 (14,7%)

Клиническим проявлением нейропатического СДС является образование трофических язв на подошвенной и медиальной поверхностях стопы (69,7% случаев). Средняя площадь дефекта составила 32,4 см². Расположение дефекта было дорсальным в 13,5% случаев, переднелатеральным в 9,75% случаев и на поверхности неопорного пальца стопы в 3,5% случаев. Скелетные деформации стопы, такие как молоткообразные пальцы и плантарный выступ, также характерны для нейропатической формы СДС.



Рис.3.1. Деформация стопы (нейропатическая форма СДС). Больная И., 63 лет



Рис.3.2. Обширная трофическая язва стопы (нейропатическая форма СДС). Больной Ф., 66 лет

Сухая и влажная гангрена, а так же ишемический некроз (гнойные поражения мягких тканей) являются отличительными признаками нейротрофической формы синдрома диабетической стопы. Нами часто наблюдались акральные некротические поражения. Во многих случаях обнаруживались следующие поражения: медиальной поверхности стоп, область головок плюсневых костей, первый палец стоп, область пятки и латеральная поверхность V плюсневой кости. Помимо мягких тканей, гнойно-некротический процесс поражает сухожилия, фасции, мелкие суставы и кости стоп (рис. 3.3 и 3.4).



Рис.3.3. Гнойно-некротическая рана левой стопы (нейроишемическая форма СДС). Больная П., 67 лет



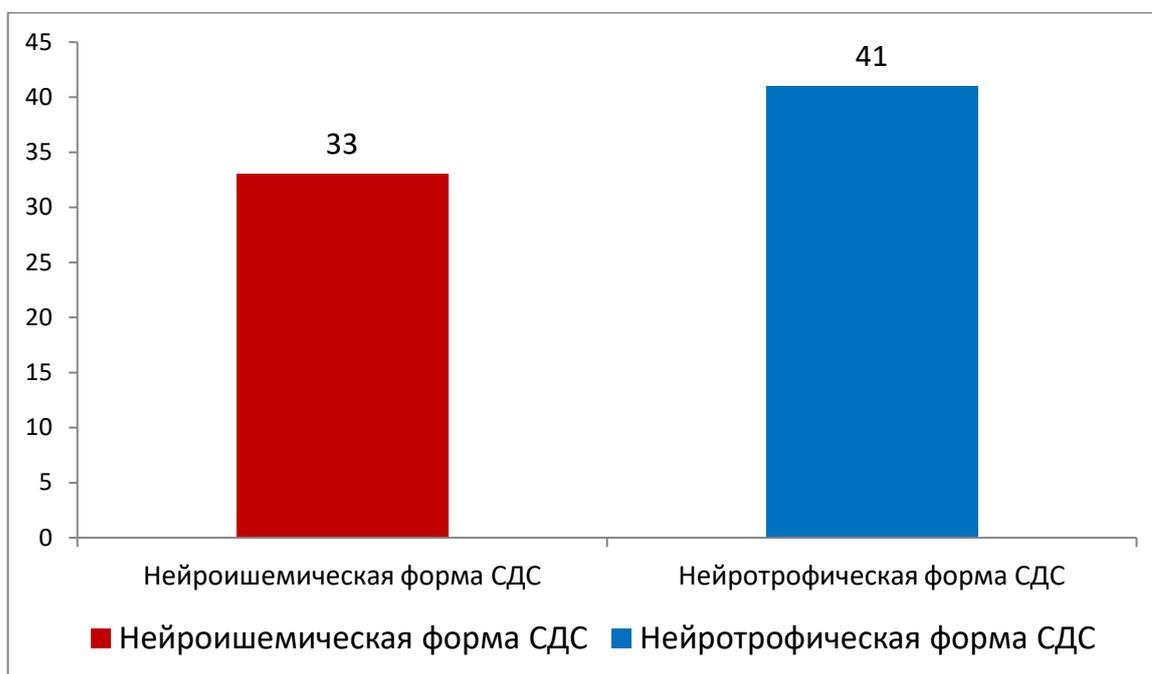
Рис.3.4. Гнойно-некротическая рана правой стопы (нейроишемическая форма СДС). Больная Д., 65 лет

Среди обследованных нами пациентов у больных с нейропатической формой СДС в трофические поражения стоп в основном были легкой (0-II ст.) степеней тяжести по Wagner J.W - 77,8%, тогда как при нейроишемической форме СДС преобладали гнойно-трофические поражения стоп средней и тяжелой (III-V ст.) степеней тяжести - 60,1%.

§3.1.4. Показатели измерения перкутанного напряжения кислорода в группах пациентов с СДС.

Для оценки степени нарушения микроциркуляции в пораженных конечностях при СДС нами было проведено определение перкутанного напряжения кислорода у больных СДС. Данные проведенного исследования представлены в рисунке 3.5. Полученные нами данные показывают, что при перкутанном измерении напряжения кислорода в пораженных конечностях имеется значимая разница в зависимости от формы СДС. Так у пациентов с нейротрофической формой СДС $T_{sp}O_2$ составило $42,3 \pm 1,6$ мм.рт.ст., а у больных с нейроишемической формой СДС – $33,7 \pm 1,9$ мм.рт.ст.

Уровень перкутанного напряжения кислорода (ТСрО₂) у
больных с СДС



Таким образом, эти данные подчеркивают более выраженные нарушения в системе региональной микроциркуляции у больных с нейроишемической формой СДС и как следствие более тяжелую степень ишемии по сравнению с нейропатической формой СДС.

**ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ
VEGFAG634C, IL-6C174G И TNF-A G308A У БОЛЬНЫХ С
СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ.**

**§ 4.1. Изучение полиморфизма G634C в гене фактора роста эндотелия
сосудов (VEGFA) у больных с СДС.**

Распределение генотипических вариантов G634C в гене VEGFA как в контрольной группе, так и в группах исследованных пациентов достигло равновесия Харди-Вайнберга (РХВ) ($p < 0.05$).

Результаты расчётов исследования отклонения фактических и ожидаемых частот распределения аллелей и генотипов полиморфизма G634C в гене VEGFA в основной и контрольной группах показали, что частота мажорного G и минорного C аллелей этого полиморфизма в основной группе соответственно составили 0,76/0,24, а в группе контроля 0,89/0,11 (табл.4.1, 4.2).

Таблица 4.1

**Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта G634C в
гене VEGFA по РХВ в основной группе.**

Аллели	Частота аллелей			
	G	0,76		
C	0,24			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
G/ G	0,59	0,57	0,09	0,21
G / C	0,32	0,37	0,57	
C / C	0,08	0,06	0,88	
Всего	1,0	1,0	1,54	

Результаты расчётов показали, что в обследованной группе больных фактическое распределение благоприятного генотипа G634G незначимо повышено по сравнению с теоретическим (0,59 против 0,57 соответственно, $\chi^2=0,09$, $p=0,21$). Вместе с тем, наблюдаемая частота неблагоприятного гетерозиготного генотипа G634C статистически незначимо ниже по

сравнению с ожидаемой (0,32 и 0,36 соответственно, $\chi^2=0,57$, $p=0,21$). Исследования показали что, неблагоприятный гомозиготный генотип С634С в основной группе был обнаружен несколько чаще по сравнению с теоретическим (0,08 против 0,06 соответственно, $\chi^2=0,88$, $p=0,21$) Относительное отклонение N_{obs} и N_{exp} оказалось отрицательным и составило $D= -0,13$ (табл. 3.7). Распределение предкового генотипа G634G, а также неблагоприятных G634С и С634С генотипов данного локуса в основной и контрольной группах соответствовали ожидаемым результатам, что свидетельствует о соблюдении равновесия Харди-Вайнберга (РХВ).

Таблица 4.2

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта G634C в гене VEGFA по РХВ в группе контроля.

Аллели	Частота аллелей			
G	0,89			
C	0,11			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
G/ G	0,81	0,79	0,02	0,24
G / C	0,17	0,19	0,26	
C / C	0,02	0,01	1,07	
Всего	1,0	1,0	1,35	

В контрольной выборке показатели N_{obs} и N_{exp} частоты гомозиготного генотипа G634G соответствовали $N_{obs}=0,81$ и $N_{exp}=0,79$ ($\chi^2=0,02$ и $p=0,24$), гетерозиготного генотипа G634C - $N_{obs}=0,17$ против $N_{exp}=0,19$ ($\chi^2=0,26$ и $p=0,24$) (табл.4.2). Различия выявлены так же по наблюдаемой и ожидаемой частоте гомозиготного генотипа G634C и составили соответственно $N_{obs}=0,02$ против $N_{exp}=0,01$ ($\chi^2=1,07$ и $p=0,24$). Относительное отклонение N_{obs} и N_{exp} в этой группе оказалось отрицательным $D= - 0,13$ (табл. 4.3).

Эти данные свидетельствуют о более высоких частотах выявленных фактически гетерозигот по сравнению с рассчитанными теоретически. Это подтверждается и отрицательным значением индекса фиксации ($D= -0,12$ и

D= -0,01) и значительным уровнем гетерозиготности данного локуса в исследуемых группах.

Таблица 4.3

Уровень гетерозиготности полиморфного варианта G634C в гене VEGFA в основной и контрольной группах.

Исследуемые группы	n	Уровень гетерозиготности		Коэффициент отклонения D*
		H _{obs}	H _{exp}	
Основная группа	96	0,32	0,37	-0,13
Контрольная группа	83	0,17	0,19	-0,13

$$*D=(H_{obs}- H_{exp})/H_{exp}$$

Результаты анализов, полученные в ходе данного исследования, по полиморфизму G634C в гене VEGFA являются презентабельными. Полученные данные показали, что в обеих группах не отмечена гетерогенность между наблюдаемыми и ожидаемыми значениями генотипов полиморфного варианта G634C в гене VEGFA. В обеих изученных выборках неблагоприятный генотип C634C был выявлен в статистически не значимых количествах. Частота выявления дикого G634G и неблагоприятного G634C генотипов данного локуса в исследованных выборках соответствовало ожидаемому, т.е. в обоих случаях выполняется равновесие Харди-Вайнберга.

§ 4.2 Изучение частоты распределения полиморфизма G634C в гене VEGFA в основной и контрольной группах.

Соответствующий анализ локуса G634C в гене VEGFA в исследованных группах пациентов с нейротрофической и нейроишемической формами СДС и контроля, как и во всех других полиморфизмах, был проведен при помощи дизайна «case-control». Проведён анализ χ^2 с вычислением отношения шансов, указывающий на вероятный шанс обнаружения синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

У исследуемых в основной и контрольной группах доля дикого аллеля G составила 75,5% и 89,2% соответственно. А неблагоприятный аллель С у больных с синдромом диабетической стопы был выявлен в 24,5% против 10,8% случаев в группе контроля (табл. 4.4).

При статистической обработке анализов было обнаружено уменьшение частоты встречаемости благоприятного аллеля G ($\chi^2=11,1$, $p=0,01$, OR=0,4, 95%CI: 0,21 – 0,67) и значимое увеличение минорного аллеля С в гене VEGFA (G634C) у больных в основной группе по сравнению с условно-здоровыми донорами.

Таблица 4.4

Носительство аллелей и генотипов полиморфизма G634C в гене VEGFA в группах пациентов и контроля.

№	Группа	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
		G		C		G/G		G/C		C/C	
		n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
1	Основная группа n=96	145	75,5	47	24,5	57	59,4	31	32,3	8	8,3
1.1	Нейроишемическая форма СДС n=61	91	74,6	31	25,4	35	57,4	21	34,4	5	8,2
1.2	Нейропатическая форма СДС n=35	54	77,1	16	22,9	22	62,9	10	28,5	3	8,6
2	Контрольная группа n=83	148	89,2	18	10,8	67	80,7	14	16,9	2	2,4

По сравнению с контролем, в основной группе больных выявлена тенденция к увеличению содержания неблагоприятного аллеля С в гене VEGFA ($\chi^2=11,1$, $p=0,01$, OR=2,7, 95%CI:1,5-4,74), что при наличии неблагоприятного аллеля С риск возникновения СДС у больных сахарным диабетом повышается в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 4.5).

Обнаружено уменьшение частоты распределения благоприятного гомозиготного генотипа G634G в исследуемой группе больных по сравнению с группой контроля (59,4% против 80,7% соответственно при $\chi^2=9,5$, $p=0,01$, $OR=0,3$, $95\%CI:0,18-0,68$) (рис.4.1).

Анализы расчётов показали, что частота обнаружения неблагоприятного гетерозиготного генотипа G634C была так же выше среди больных по сравнению с группой контроля (32,3% против 16,9% соответственно, при $\chi^2=5,6$, $p=0,8$, $OR=2,4$, $95\%CI:1,16-4,76$) (табл. 4.5).

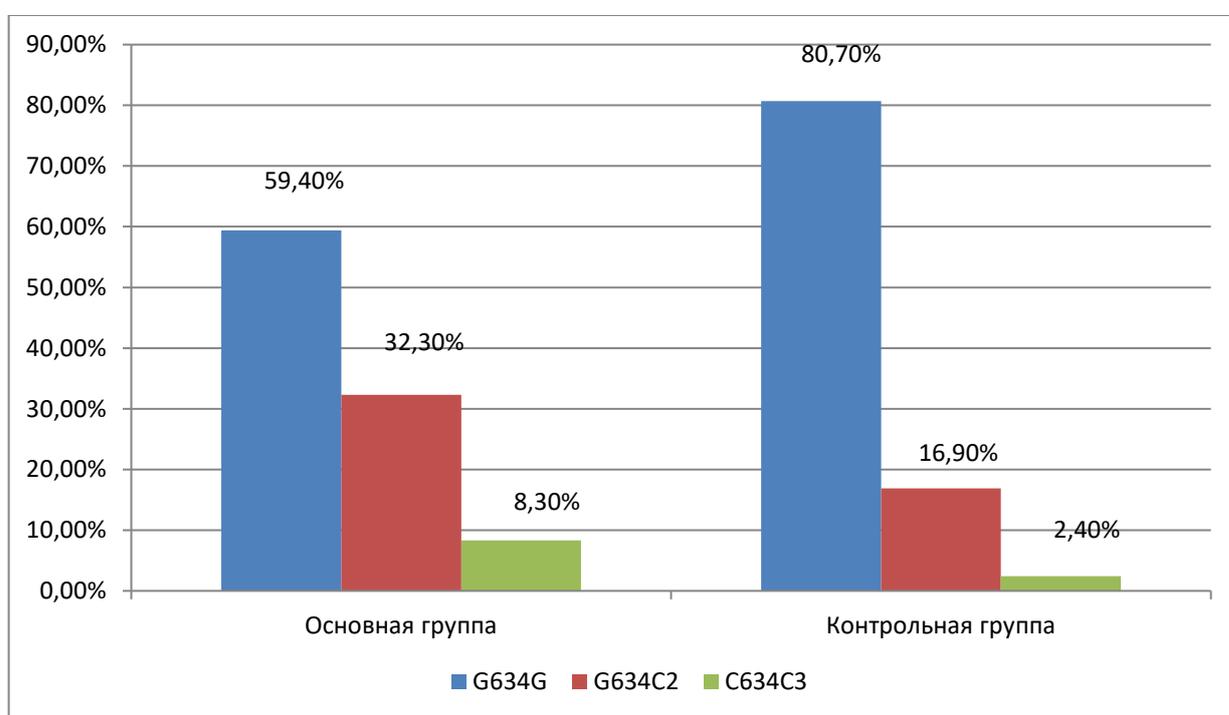


Рис. 4.1. Распределение генотипов полиморфизма G634C в гене VEGFA в основной выборке пациентов (n=96) и в группе контроля (n=83).

Рассчитанный коэффициент отношения шансов показал, что в основной группе больных выявлена тенденция к увеличению доли мутантного гомозиготного генотипа C634C в гене VEGFA ($\chi^2=3,0$, $p=0,1$, $OR=3,7$, $95\%CI:0,83-16,25$). При наличии мутантного гомозиготного генотипа C634C в гене VEGFA в основной группе больных риск формирования СДС у больных сахарным диабетом повышается в 3,7 раза, чем в группе контроля (табл. 4.5).

Таблица 4.5

Частота распределения полиморфизма G634C в гене VEGFA в основной группе больных и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95% CI
	Основная группа		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
G	145	75,5	148	89,2	11,1	p = 0,01	0,4	0,21 – 0,67
C	47	24,5	18	10,8	11,1	p = 0,01	2,7	1,5 – 4,74
G/G	57	59,4	67	80,7	9,5	p = 0,01	0,3	0,18 – 0,68
G/C	31	32,3	14	16,9	5,6	p=0,025	2,4	1,16 – 4,76
C/C	8	8,3	2	2,4	3,0	p = 0,1	3,7	0,83 – 16,25

Таким образом, полученные результаты показали, что выявление предкового аллеля G и связанного с ним благоприятного гомозиготного генотипа G634G оказывает протективный эффект и не оказывает влияния на возможность развития синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом. Вместе с тем, риск возникновения СДС у больных сахарным диабетом значительно возрос при наличии минорного аллеля C и связанного с ним мутантного гомозиготного генотипа G634C, а так же при выявлении гетерозиготного генотипа G634C в гене VEGFA в исследуемой группе пациентов по сравнению с группой контроля.

Верификация основной группы больных на подгруппы усиливает значения OR и позволяет более точно оценить уровень ассоциированности. В связи с этим, на следующем этапе нашего исследования был проведён сравнительный анализ полиморфизма G634C в гене VEGFA в каждой подгруппе больных с синдромом диабетической стопы.

Оценка частоты распределения полиморфизма G634C в гене VEGFA у больных с нейроишемической формой СДС и группой контроля.

Расчёты анализов статистической обработки показали, что частота выявления дикого аллеля G в гене VEGFA незначимо ниже в группе больных с нейроишемической формой СДС по сравнению с контролем (74,6% и 89,2% соответственно, при $\chi^2=10,6$, $p=0,01$, OR=0,4, 95%CI:0,19-0,66). Частота распределения неблагоприятного аллеля С в гене VEGFA у пациентов с нейроишемической формой СДС была выше, чем в группе контроля (25,4% и 10,8% соответственно, при $\chi^2=10,6$, $p=0,5$, OR=2,8, 95%CI:1,51-5,21) (табл.4.6).

Доля встречаемости обследованных генотипов G634G, G634C, C634C у больных с нейропатической формой СДС и контроля были следующими: 57,4%, 34,4% и 8,2% против 80,7%, 16,9% и 2,06% соответственно.

В результате исследования было выявлено незначительное уменьшение частоты встречаемости предкового гомозиготного генотипа G634G (57,4% и 80,7% соответственно при $\chi^2=9,3$, $p=0,9$, OR=0,3, 95%CI:0,4-2,12).

Таблица 4.6

Частота распределения полиморфизма G634C в гене VEGFA в группе больных с нейроишемической формой СДС и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	p	OR	95%CI
	Нейроишемическая форма СДС		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
G	48	77,4	179	81,4	0,5	p=0,5	0,8	0,4 - 1,56
C	14	22,6	41	18,6	0,5	p=0,5	1,3	0,64 - 2,52
G/G	20	64,5	73	66,4	0,0	p=0,9	0,9	0,4 - 2,12
G/C	8	25,8	33	30,0	0,2	p=0,7	0,8	0,33 – 2,0
C/C	3	9,7	4	3,6	1,9	p=0,2	2,8	0,64 - 12,67

Нами было установлено, что выявление генотипа G634G у больных с нейроишемической формой СДС не повышает вероятность развития данного заболевания по сравнению с группой контроля.

В ходе данного исследования было установлено, что и неблагоприятные гетерозиготный генотип G634C и гомозиготный маркер C634C были выявлены в исследуемой группе в 34,4% и 8,2% случаях относительно группы контроля - 16,9% и 2,4% соответственно (таб. 4.6). При наличии неблагоприятного гетерозиготного генотипа G634C и гомозиготного генотипа C634C есть тенденция к увеличению риска развития нейроишемической формой СДС в 2,6 раза и 3,6 раза по сравнению контрольной группой (при $\chi^2=5,9$, $p=0,025$, $OR=2,6$, $95\%CI: 1,2-5,58$ и $\chi^2=2,5$, $p=0,2$, $OR=3,6$, $95\%CI: 0,75-17,54$ соответственно) (таб. 4.6).

Из этого следует, что носительство неблагоприятных генотипов G634C и C634G в гене VEGFA оказывает достоверное влияние на риск развития нейроишемической СДС по сравнению с группой контроля.

Определение ассоциативной связи между полиморфизмом G634C в гене VEGFA у больных с нейропатической формой СДС и группой контроля.

В результате проведённого исследования было определено, что в группе обследуемых пациентов с нейропатической формой СДС и группе контроля частота выявления дикого G аллеля составила 77,1% и 98,2% соответственно при $\chi^2=5,8$, $p=0,025$, $OR=0,4$, $95\%CI:0,2-0,85$ (рис. 4.2). А доля неблагоприятного аллеля C у больных был выявлен соответственно в 22,9% против 10,8% случаев при $\chi^2=5,8$, $p=0,025$, $OR=2,4$, $95\%CI:1,18-5,04$ (табл. 3.11).

Проведение статистических анализов показало, что частота встречаемости благоприятного генотипа G634G ниже у больных с нейропатической формой СДС, чем в группе контроля ($\chi^2=4,2$, $p=0,005$, $OR=0,4$, $95\%CI:0,17-0,96$) (табл. 4.7).

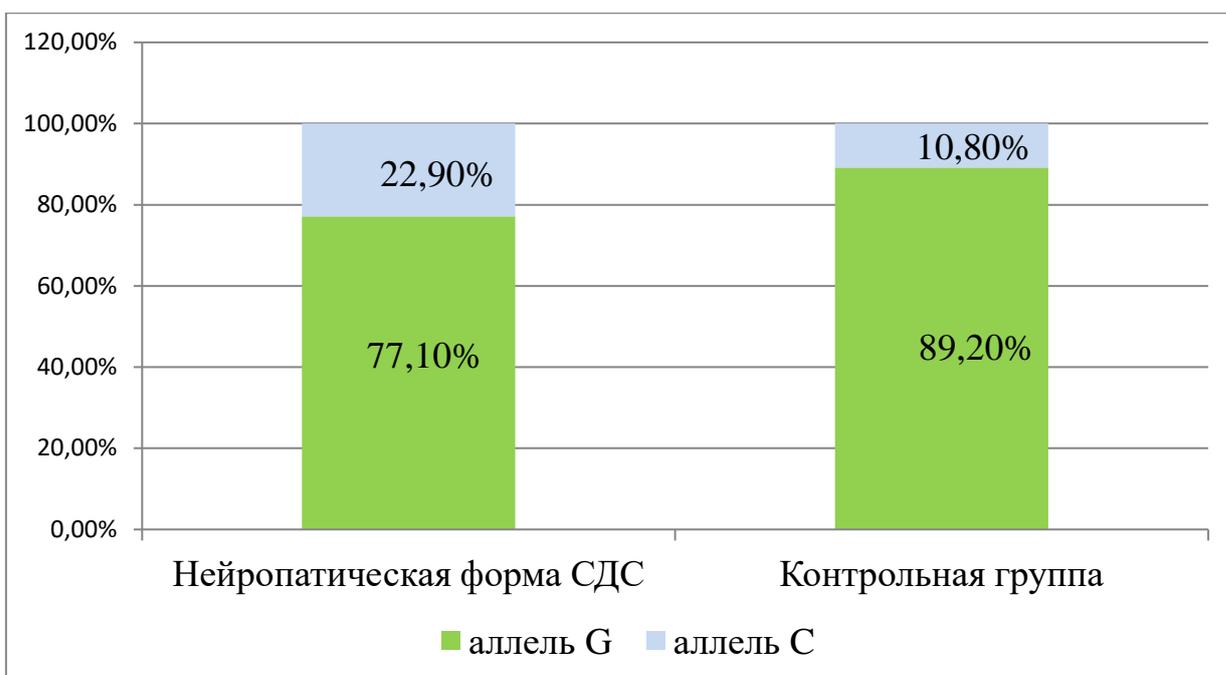


Рис. 4.2. Распределение частот аллельных вариантов полиморфизма G634C в гене VEGFA у больных с нейропатической формой СДС (n=35) и в группе контроля (n=83).

Гетерозиготный генотип G634C был незначительно выше в группе больных с нейропатической формой СДС, чем в контроле ($\chi^2=2,1$, $p=0,2$, $OR=2,0$, $95\%CI:0,78-21,24$) (табл.4.7). В ходе исследования была обнаружена тенденция к увеличению частоты встречаемости неблагоприятного генотипа C/C.

Таблица 4.7

Частота распределения полиморфизма G634C в гене VEGFA в группе больных с нейропатической формой СДС и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95% CI
	Нейропатическая форма СДС		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
G	54	77,1	148	89,2	5,8	$p=0,025$	0,4	0,2 - 0,85
C	16	22,9	18	10,8	5,8	$p=0,025$	2,4	1,18– 5,04
G/G	22	62,9	67	80,7	4,2	$p=0,05$	0,4	0,17–0,96
G/C	10	28,6	14	16,9	2,1	$p=0,2$	2,0	0,78- 4,96
C/C	3	8,6	2	2,4	2,3	$p=0,2$	3,8	0,68– 21,27

Таким образом, риск развития и вероятность формирования нейропатической формы СДС при наличии данного маркера повышается на 3,8 раза по сравнению с контрольной группой ($\chi^2=2,3$, $p=0,2$, $OR=3,8$, $95\%CI:0,68-21,27$) (табл. 4.7)

Результаты изучения частоты распределения полиморфизма G634C в гене VEGFA у больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС.

В данном исследовании было отмечено незначительное уменьшение частоты дикого аллеля G и умеренное повышение доли носительства неблагоприятного аллеля C у больных с нейропатической формой СДС чем в группе пациентов с нейроишемической формой СДС (77,1% и 74,6%, 22,9% и 25,4% соответственно) (табл. 4.8).

Анализ генетического маркера гена VEGFA показывает, что шанс обнаружения нейропатической формой СДС не повышается при наличии выше указанных аллелей по сравнению с больными нейроишемической

Таблица 4.8

Частота распределения полиморфизма полиморфизма G634C в гене VEGFA в группе больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95%CI
	Нейро-ишемическая форма СДС		Нейро-патическая форма СДС					
	n	%	n	%				
G	91	74,6	54	77,1	0,2	p = 0,7	0,9	0,44 - 1,74
C	31	25,4	16	22,9	0,2	p = 0,7	1,1	0,58 - 2,29
G/G	35	57,4	22	62,9	0,3	p = 0,6	0,8	0,34 - 1,87
G/C	21	34,4	10	28,6	0,3	p = 0,6	1,3	0,53 - 3,24
C/C	5	8,2	3	8,6	0,0	p = 0,95	1,0	0,21 - 4,25

формой СДС ($\chi^2=0,2$, $p=0,7$, $OR=0,9$, $95\%CI:0,44-1,74$ и $\chi^2=0,2$, $p=0,7$, $OR=1,1$, $95\%CI:0,58-2,29$).

Как видно из рис. 4.3 и таблицы 4.8, количество выявления дикого генотипа G/G было не достоверно выше (62,9 % и 57,4% соответственно, при $\chi^2=0,3$, $p=0,6$, $OR=0,8$, $95\%CI:0,34-1,87$) и частота распределения неблагоприятного маркера C/C была так же незначимо больше (8,6% и 8,2% соответственно, при $\chi^2=0,0$, $p=0,95$, $OR=1,0$, $95\%CI:0,21-4,25$) у больных с нейропатической формой СДС, чем в группе пациентов с нейроишемической формой СДС.

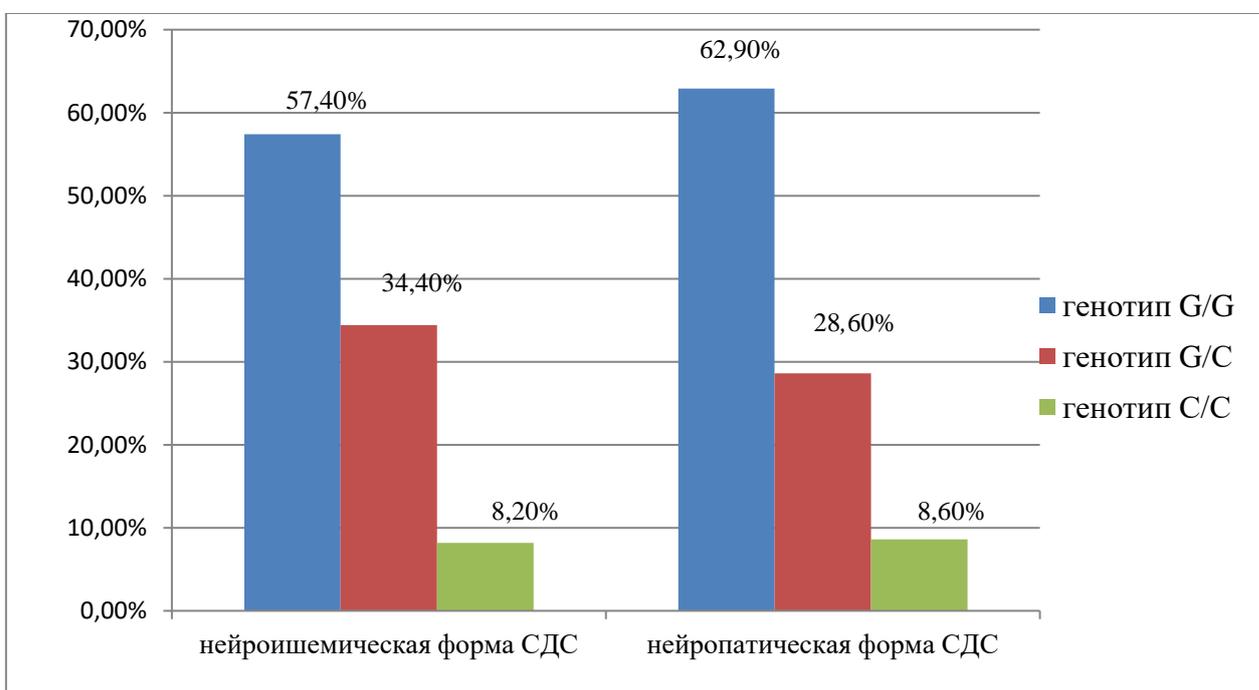


Рис. 4.3. Распределение генотипов полиморфизма G634C в гене VEGFA в группе больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС.

Расчёты статистических данных показывают тенденцию к увеличению частоты встречаемости гетерозиготного маркера G/C у больных с нейроишемической формой СДС по сравнению с пациентами с нейропатической формой СДС. Степень различия в частоте распределения неблагоприятного маркера G/C у больных с нейроишемической формой СДС в 1.3 раза больше (34,4% и 28,6% соответственно, при $\chi^2=0,3$, $P=0,6$, $OR=1,3$, $95\%CI:0,53-3,24$), чем у пациентов с нейропатической формами СДС.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что полиморфизм G634C (rs2010963) в гене VEGFA вовлечен в формирование и развитие синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом, наличие аллеля С и генотипов G/C и C/C полиморфизма G634C в гене VEGFA значительно повышает риск, а обладание аллелем G и генотипом G/G снижает риск формирования СДС у больных сахарным диабетом. Различия в распределении неблагоприятного маркера G/C у больных с нейропатической формой СДС по сравнению с нейроишемической свидетельствует о том, что в патогенезе последней играют большую роль грубые нарушения ангиогенеза, в основе которого лежит уменьшение экспрессии VEGFA. Это приводит к формированию длительно не заживающих язвенных дефектов на конечности.

§4.2. Изучение места полиморфизма C174G в гене IL6 и их роли в развитии синдрома диабетической стопы

Анализ частоты распределения аллелей и генотипов полиморфизма C174G в гене IL6.

При исследовании в основной и контрольной группах фактическое распределение генотипов полиморфизма C174G гена IL6 соответствовало ожидаемому при каноническом распределении Харди-Вайнберга (ХВ) ($p < 0.05$). Полученные нами результаты показали, что С и G аллели генетического маркера IL6 в основной группе выявлены с частотой соответственно 0,83/0,17. В контрольной группе это распределение было 0,88/0,12 соответственно (табл.4.9, 4.10).

Результаты показали, что в обследованной группе больных фактическое распределение благоприятного генотипа C174C незначимо повышено по сравнению с теоретическим (0,71 против 0,69 соответственно, $\chi^2 = 0,03$, $p = 0,315$). Вместе с тем, наблюдаемая частота гетерозиготного генотипа C174G статистически незначимо ниже по сравнению с ожидаемой (0,25 и 0,28 соответственно, $\chi^2 = 0,27$, $p = 0,315$). Анализы исследования показали что, неблагоприятный гомозиготный генотип G174G в основной

группе был обнаружен в незначительных количествах – 0,04 против 0,03, $\chi^2=0,67$. Относительное отклонение H_{obs} и H_{exp} оказалось отрицательным и составило $D= -0,1$ (табл. 4.11).

Таблица 4.9

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта С174G в гене IL6 по PХВ в основной группе.

Аллели	Частота аллелей			
С	0,83			
G	0,17			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	Р
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
С/С	0,71	0,69	0,03	0,315
С/G	0,25	0,28	0,27	
G/G	0,04	0,03	0,67	
Всего	1,0	1,0	0,96	

В контрольной группе наблюдаемые количества гетерозигот (H_{obs}) данного полиморфизма оказались одинаковыми с ожидаемыми $D = - 0,4$ и $D= -0,01$ соответственно (табл.4.11).

Таблица 4.10

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта С174G в гене IL6 по PХВ в группе контроля.

Аллели	Частота аллелей			
С	0,88			
G	0,12			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	Р
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
С/С	0,8	0,77	0,5	0,064
С/G	0,17	0,21	0,73	
G/G	0,04	0,73	2,67	
Всего	1,0	1,0	3,46	

Эти данные свидетельствуют о более высоких частотах выявленных фактических гетерозигот по сравнению с рассчитанными теоретически. Об этом свидетельствуют и отрицательное значение индекса фиксации ($D= -0,1$

и $D = -0,01$) и значительный уровень гетерозиготности данного локуса в исследуемых группах.

Таблица 4.11

Уровень гетерозиготности полиморфного варианта C174G в гене IL6 в основной и контрольной группах.

Исследуемые группы	N	Уровень гетерозиготности		Коэффициент отклонения D*
		H _{obs}	H _{exp}	
Основная группа	96	0,35	0,4	-0,1
Контрольная группа	83	0,4	0,4	-0,2

$$*D = (H_{obs} - H_{exp}) / H_{exp}$$

В контрольной выборке показатели фактической и теоретической частоты распределения гомозиготного генотипа C174C мало отличались друг от друга и различия эти недостоверны. В контрольной выборке показатели наблюдаемой и ожидаемой частоты гомозиготного генотипа C174C соответствовали $H_{obs} = 0,8$ и $H_{exp} = 0,77$ ($\chi^2 = 0,05$ и $p = 0,064$), гетерозиготного генотипа C174G - $H_{obs} = 0,17$ против $H_{exp} = 0,21$ ($\chi^2 = 0,73$ и $p = 0,064$). Гомозиготный генотип G174G - $H_{obs} = 0,04$ против $H_{exp} = 0,01$ ($\chi^2 = 2,67$ и $p = 0,064$). Относительное отклонение H_{obs} и H_{exp} в этой группе также оказалось отрицательным: $D = -0,2$ (таблица 4.11).

Таким образом, полученные популяционно-генетические данные по полиморфизму C174G в гене IL6 являются показательными. В исследованных группах пациентов с синдромом диабетической стопы и контрольной выборкой отмечена незначительная гетерогенность между фактически-наблюдаемыми и теоретически-ожидаемыми значениями генотипов полиморфного варианта C174G в гене IL6. В обеих изученных выборках неблагоприятный гомозиготный генотип G174G присутствовал в статистически незначимых количествах. Распределение предкового гомозиготного C174C и неблагоприятного гетерозиготного C174G генотипов данного локуса в исследованных выборках соответствовало ожидаемому т.е., в обоих случаях выполняется равновесие Харди-Вайнберга, что

свидетельствует об однородности исследованных выборок и о качественно выполненном генотипировании данного локуса (отсутствие ошибок генотипирования).

Изучение ассоциативной связи между полиморфизмом C174G в гене IL6 в основной и контрольной группах.

Коррелятивный анализ локуса C174G в гене IL6 в исследованных группах пациентов с нейроишемическими и нейропатической формами СДС, а так же контроля, как и во всех других полиморфизмах, был проведен при помощи дизайна «case-control». Проведён анализ χ^2 с вычислением отношения шансов, указывающий на вероятный риск формирования различных форм СДС у больных сахарным диабетом.

Статистическая обработка показала, что частота благоприятного аллеля С незначительно выше в основной группе по сравнению с контролем и его обнаружение не влияет на угрозу развития СДС у больных сахарным диабетом (83,3% и 88,0% соответственно, при $\chi^2=1,5$, $p=0,3$, OR=0,7, 95% CI: 0,38-1,25

Таблица 4.12

Носительство аллелей и генотипов полиморфизма C174G в гене IL6 в исследуемых и контрольной группах.

№	Группа	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
		С		G		C/C		C/G		G/G	
		N	%	N	%	N	%	N	%	n	%
1	Исследуемая группа n=96 из них:	160	83,3	32	16,7	68	70,8	24	25	4	4,2
1.1	Нейроишемической формой СДС n=61	100	82,0	22	18,0	42	68,9	16	26,2	3	4,9
1.2	Нейропатической форма СДС n=35	60	85,7	10	14,3	26	74,3	8	22,9	1	2,8
2	Контрольная группа n=83	146	87,9	20	12,1	66	79,5	14	16,9	3	3,6

Рассчитанный коэффициент отношения шансов показал, что при обнаружении функционального неблагоприятного аллеля G у пациентов был в 1,5 раза выше риск развития синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом по сравнению с представителями контрольной группы (16,7% и 12,0% соответственно, при $\chi^2=1,5$, $p=0,9$, OR=1,5, 95%CI:0,52-2,15) (табл.4.12).

Обнаружено незначительное уменьшение предкового генотипа C/C в исследуемой группе (55,1% против 52,4% соответственно при OR=1,1, 95%CI:0,65-1,91, $\chi^2=0,1$, $p=0,7$), а также частоты генотипа мутантного типа G174G среди группы контроля по сравнению с группой исследуемых больных (3,6% против 4,2% соответственно, при $\chi^2=0,0$, $p=0,9$, OR=1,2, 95%CI:0,25-5,33) (рис.4.4, табл.4.13).

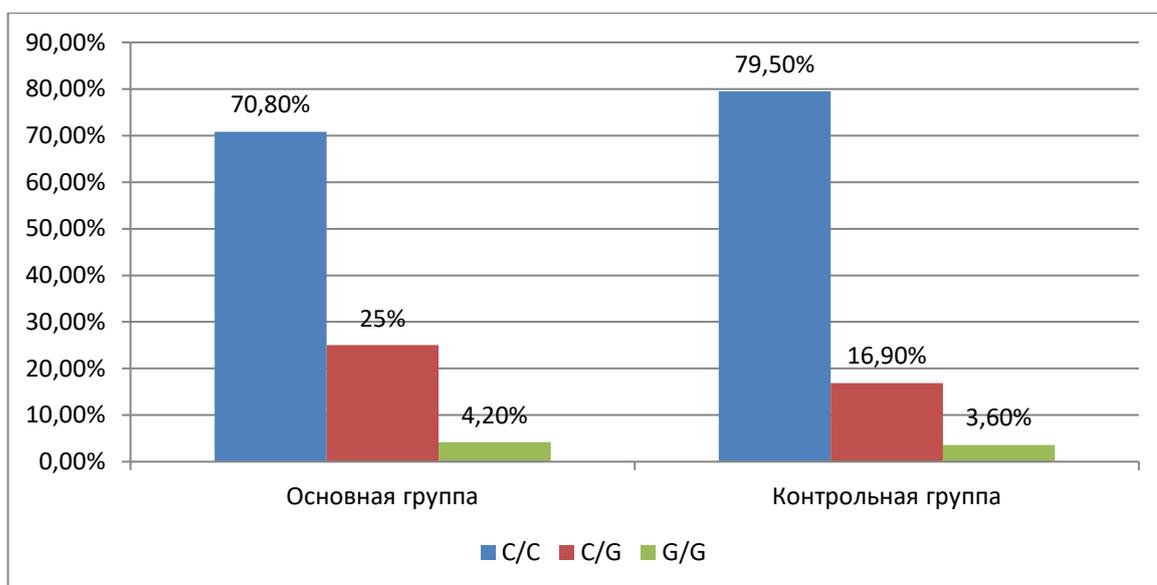


Рис.4.4. Распределение генотипов полиморфизма C174G в гене IL6 в основной группе (n=96) и группе контроля (n=83).

Выявлено незначимое увеличение доли носителей неблагоприятного гетерозиготного генотипа C174G среди больных по сравнению с группой контроля (соответственно 25,0% и 16,9%). При наличии данного генотипа присутствует угроза формирования синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом в 1,6 раза чаще ($\chi^2=1,8$, $p=0,2$, OR=1,6, 95%CI:0,46-1,4) (табл.4.13).

Таблица 4.13

Ассоциативная связь между полиморфизмом С174G в гене IL6 в группах пациентов и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95%CI
	Основная группа		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
C	160	83,3	146	88,0	1,5	p = 0,3	0,7	0,38 - 1,25
G	32	16,7	20	12,0	1,5	p = 0,3	1,5	0,8 - 2,66
C / C	68	70,8	66	79,5	1,8	p = 0,2	0,6	0,31 - 1,25
C / G	24	25,0	14	16,9	1,8	p = 0,2	1,6	0,79 – 3,42
G / G	4	4,2	3	3,6	0,0	p = 0,9	1,2	0,25 – 5,33

Верификация основной группы пациентов на подгруппы позволяет более точно оценить уровень ассоциированности. В связи с этим, в следующем этапе нашего исследования был проведён сравнительный анализ полиморфизма С174G в гене IL6 в каждой подгруппе пациентов с синдромом диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

Оценка частоты распределения полиморфизма С174G в гене IL6 у больных с нейроишемической формой синдрома диабетической стопы и контрольной группой

Рассчитанный коэффициент отношения шансов показал, что шанс обнаружения функционального неблагоприятного аллеля G у респондентов с нейроишемической формой СДС незначимо повышался по сравнению с представителями контрольной группы (18,0% и 12,0% соответственно). Данные расчётов показывают, что при наличии такого аллеля риск развития ишемической формы СДС повышался в 1,6 раза ($\chi^2=2,0$, p=0,2, OR=1,6, 95%CI:0,84-3,09). Выявлено, что статистическое различие гомозиготного варианта генотипа С174С и неблагоприятного мутантного генотипа G/G у больных с выше перечисленной патологией было незначимым. И это указывает на то, что при наличии этих генотипов отсутствует риск

формирования этой патологии (при $\chi^2=2,1$, $p=0,2$, $OR=0,6$, $95\%CI:0,27-1,21$ и $\chi^2=0,1$, $p=0,7$, $OR=1,4$, $95\%CI:0,27-7,04$) (табл.4.16).

Таблица 4.16

Ассоциативная связь между полиморфизмом C174G в гене IL6 в группах пациентов с нейроишемической формой СДС и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95%CI
	Нейро - ишемическая форма СДС		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
C	100	82,0	146	88,0	2,0	$p = 0,2$	0,6	0,32 - 1,2
G	22	18,0	20	12,0	2,0	$p = 0,2$	1,6	0,84 – 3,09
C / C	42	68,9	66	79,5	2,1	$p = 0,2$	0,6	0,27 - 1,21
C / G	16	26,2	14	16,9	1,9	$p = 0,2$	1,8	0,78 - 3,92
G / G	3	4,9	3	3,6	0,1	$p = 0,7$	1,4	0,27 – 7,04

Вместе с тем, в ходе исследования выявлено, что при обнаружении гетерозиготного генотипа C174G шанс развития нейроишемической формы СДС увеличивается в 1,8 раза (при $\chi^2=1,9$, $p=0,2$, $OR=1,8$, $95\%CI:0,78-3,92$).

Оценка частоты распределения полиморфизма C174G в гене IL6 у больных с нейропатической формой синдрома диабетической стопы и контрольной группой

У пациентов с нейропатической формой СДС несмотря на незначимые различия, выявлено уменьшение частоты благоприятного аллеля C (85,7% и 88,0%, соответственно) и увеличение частоты мутантного маркера G (14,3% и 12,0%, соответственно). Результаты показывают, что обнаружение этих аллелей не являются большой угрозой развития нейропатической формой СДС ($\chi^2=0,2$, $p=0,7$, $OR=0,8$, $95\%CI:0,36-1,86$ и $\chi^2=0,2$, $p=0,7$, $OR=1,2$, $95\%CI:0,54-2,75$, соответственно). Частоты C174C, C174G, G174G генотипов у больных с нейропатической формой СДС и группой контроля составили: 74,3%, 22,9% и 2,9% против 79,5%, 16,9% и 3,6% соответственно. Изучение

ассоциативной связи между полиморфизмом С174G в гене IL6 в этой группе больных показал, что статистическое различие при выявлении дикого генотипа С174С (при $\chi^2=0,4$, $p=0,6$, $OR=0,7$, $95\%CI:0,3-1,88$) и неблагоприятного генотипа G174G было незначимым (при $\chi^2=0,0$, $p=0,9$, $OR=0,8$, $95\%CI:0,08-7,77$) (табл.4.17).

Таблица 4.17

Ассоциативная связь между полиморфизмом С174G в гене IL6 в группах пациентов с нейропатической формой СДС и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95%CI
	Нейропатическая форма СДС		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
С	100	82,0	146	88,0	2,0	$p = 0,2$	0,6	0,32 - 1,2
G	22	18,0	20	12,0	2,0	$p = 0,2$	1,6	0,84 – 3,09
С / С	42	68,9	66	79,5	2,1	$p = 0,2$	0,6	0,27 - 1,21
С / G	16	26,2	14	16,9	1,9	$p = 0,2$	1,8	0,78 - 3,92
G / G	3	4,9	3	3,6	0,1	$p = 0,7$	1,4	0,27 – 7,04

Это свидетельствует об отсутствии вклада этих маркеров в развитие нейропатической формы СДС.

Анализ частоты распределения полиморфизма С174G в гене IL6 у больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС

При сравнительном анализе полиморфного маркера С174G в гене IL6 в подгруппе пациентов с нейроишемической и нейропатической формами СДС получены следующие результаты.

В подгруппе больных с нейроишемической формой СДС благоприятный аллель С был выявлен у 82,0% пациентов, а неблагоприятный аллель Arg был обнаружен в 18% случаях. (таб.4.18).

Таблица 4.18

Частота распределения полиморфизма С174G в гене IL6 в группе больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС.

Аллель и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	p	OR	95%CI
	Нейроишемическая форма СДС		Нейропатическая форма СДС					
	N	%	n	%				
C	100	82,0	60	85,7	0,4	p = 0,6	0,8	0,34 - 1,71
G	22	18,0	10	14,3	0,4	p = 0,6	1,3	0,59 - 2,97
C / C	42	68,9	26	74,3	0,3	p = 0,6	0,8	0,3 - 1,94
C / G	16	26,2	8	22,9	0,1	p = 0,8	1,2	0,45 – 3,17
G / G	3	4,9	1	2,9	0,2	p = 0,7	1,8	0,18 – 17,11

Частота распределения выше указанных аллелей показала незначительное различие между больными с нейроишемической и нейропатической формами СДС ($\chi^2=0,4$, $p=0,6$, $OR=0,8$, $95\%CI:0,34-1,71$ и $\chi^2=0,4$, $p=0,6$, $OR=1,3$, $95\%CI:0,59-2,97$) (таб.4.18). Далее, в ходе данного исследования, была проанализирована частота распределения полиморфных маркеров С174С, С174G, G174G в гене IL6 в группе больных с ишемической и нейроишемической формами СДС.

Генотипы С174С, С174G мало различались у больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС (С174С – 68,9% и 74,3% соответственно, при $\chi^2=0,3$, $p=0,4$, $OR=0,8$, $95\%CI:0,3-1,94$, С174G - 26,2% и 22,9% соответственно, при $\chi^2=0,1$, $p=0,3$, $OR=1,2$, $95\%CI:0,45-3,17$).

По результатам анализа полученных нами данных было установлено, что носительство генотипа G174G повышало вероятность перехода нейропатической формы СДС в более тяжелую нейроишемическую форму в 1,8 раза (4,9% и 2,9 % соответственно, при $\chi^2=0,2$, $OR=1,8$, $95\%CI:0,18-17,11$, $p=0,9$). Аллель G, а так же и генотипы C/G и G/G полиморфизма С174G гена IL6 имеют четкую корреляционную связь с предрасположенностью к формированию СДС. Носительство аллеля А и генотипа генотипа С/С полиморфизма С174G гена IL6 ассоциировано с протективным эффектом

относительно развития синдрома диабетической стопы, что связано с уменьшением экспрессии провоспалительного цитокина IL6

§4.3. Анализ частоты распределения полиморфизма полиморфизм G308A в гене TNF – α у больных СДС

Оценка частоты выявления аллелей и генотипов полиморфизма G308A в гене TNF–α у пациентов с СДС.

Частоту распределения аллелей и генотипов полиморфного локуса rs1800629 в гене TNF–α в группах пациентов и контроля контролировали на соответствие равновесию Харди-Вайнберга.

Распределение генотипических вариантов G308A (rs1800629) в гене TNF–α как в контрольной группе, так и в группах исследованных пациентов достигло равновесия Харди-Вайнберга (РХВ) ($p < 0.05$). В основной и контрольной группах частота распределения аллелей G и A генетического маркера rs1800629 в гене TNF–α были практически одинаковыми и составили соответственно в исследуемой группе - 0,9/0,1 и 0,95/0,05 в группе контроля (табл.4.19,4.20).

Таблица 4.19

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта G308A в гене TNF–α по РХВ в основной группе.

Аллели	Частота аллелей			
	G	0,9		
A	0,1			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P
	Наблюдаемая	Ожидаемая		
G/G	0,8	0,81	0,01	0,271
G/A	0,2	0,18	0,21	
A/A	0	0,01	0,94	
Всего	1,0	1,0	1,16	

В группе пациентов наблюдаемое распределение гомозиготного генотипа G/G незначимо снижено по сравнению с теоретическим (0,8 и 0,81 соответственно, $\chi^2=0,01$, $p=0,271$). Напротив, наблюдаемая частота

гетерозиготного генотипа G/A статистически незначимо выше по сравнению с ожидаемой (0,2 и 0,18 соответственно, $\chi^2=0,21$, $p=0,271$). Неблагоприятный гомозиготный генотип A/A в исследованных группах обнаружен не был. Относительное отклонение H_{obs} и H_{exp} оказалось положительным и составило $D=+0,11$.

В контрольной выборке показатели наблюдаемой и ожидаемой частоты генотипов было одинаковым без значимых различий (табл. 4.20). Относительное отклонение H_{obs} и H_{exp} в этой группе также оказалось положительным $D=+ 0,06$ (табл. 4.21).

Таблица 4.20

Распределение аллелей и генотипов полиморфного варианта G308A в гене TNF- α по РХВ в контрольной группе.

Аллели	Частота аллелей			
G	0,54			
A	0,46			
Генотипы	Частота генотипов		χ^2	P
	<i>Наблюдаемая</i>	<i>Ожидаемая</i>		
G/G	0,89	0,89	0	0,572
G/A	0,11	0,1	0,03	
A/A	0	0	0,24	
Всего	1,0	1,0	0,27	

Таблица 4.21

Уровень гетерозиготности полиморфного варианта G308A в гене TNF- α в основной группе.

Исследуемые группы	n	Уровень гетерозиготности		Коэффициент отклонения D*
		H_{obs}	H_{exp}	
Основная группа	96	0,2	0,18	+0,11
Контрольная группа	83	0,11	0,1	+0,02

$$*D=(H_{obs}- H_{exp})/H_{exp}$$

Соответственно, полученные данные расчётов по полиморфизму G308A в гене TNF- α являются взаимно совокупными. В исследуемой и

контрольной группах не обнаружена гетерогенность между N_{obs} и N_{exp} значениями генотипов полиморфного варианта G308A в гене TNF- α . В изученной группе мутантный генотип A/A не был выявлен. Частота распределения предкового гомозиготного G/G и неблагоприятного гетерозиготного G/A генотипов данного локуса в исследованных выборках соответствовала ожидаемому, т.е. в обоих случаях выполняется равновесие Харди-Вайнберга, свидетельствующее об отсутствии ошибок генотипирования.

Ассоциативная связь между полиморфизмом G308A в гене TNF- α в исследуемых группах и их роль в риске развития синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

Для оценки коррелятивной связи аллелей и генотипов полиморфизма G308A в гене TNF- α с риском формирования СДС у больных сахарным диабетом использовали критерий χ^2 . В основной группе пациентов и контроля доля дикого G аллеля составила 90,1% и 94,6% соответственно (табл.4.22).

Таблица 4.22

Носительство аллелей и генотипов полиморфизма G308A в гене TNF- α в основной и контрольной группах.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95%CI
	Основная группа		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
G	173	90,1	157	94,6	2,5	p = 0,2	0,5	0,23 - 1,17
A	19	9,9	9	5,4	2,5	p = 0,2	1,9	0,85 - 4,31
G / G	77	80,2	74	89,2	2,7	p = 0,2	0,5	0,21 - 1,15
G / A	19	19,8	9	10,8	2,7	p = 0,2	2,0	0,87 - 4,72

A мутантный аллель A у больных с синдромом диабетической стопы был выявлен соответственно в 9.9% против 5.4% случаях.

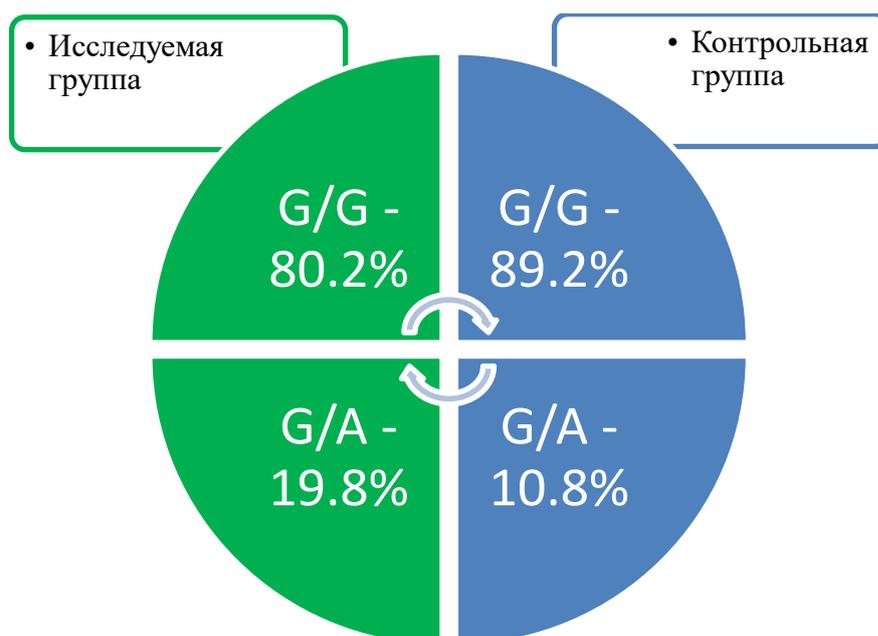


Рис.4.5. Носительство генотипов полиморфизма G308A в гене TNF- α в основной (n=96) и контрольной группе (n=83).

При статистической обработке анализов выявлено незначимое уменьшение частоты благоприятного аллеля G и незначительное увеличение доминирующего, мутантного аллеля A у больных в основной группе по сравнению с условно-здоровыми донорами.

Носительство мутантного A аллеля ассоциировано с 1,9-кратным увеличением риска формирования СДС у больных сахарным диабетом по сравнению с представителями контрольной группы ($\chi^2=2,5$, $p=0,2$, OR=1,9, 95% CI:0,85-4,31).

В основной группе пациентов с синдромом диабетической стопы гомозиготный вариант мутации G308G был выявлен – у 80,2% больных, гетерозиготный вариант G/A – у 19,8% (рис.4.5). Мутантный гомозиготный генотип A308A у больных в исследуемой группе больных синдромом диабетической стопы нами обнаружен не был. Соответственно в группе контроля эти генотипы были выявлены у 89,2%, и 10,8% лиц (рис.4.5). Было обнаружено незначительное уменьшение доли носителей дикого генотипа G308G и неблагоприятного генотипа G308A среди больных по

сравнению с группой контроля (80,2% и 19,8% против 89,2% и 10,8% соответственно). Коэффициент соотношения шансов показал, что наличие носительства генотипа G308G среди здоровых людей оказалось достоверно выше, чем у пациентов основной группы и данный генотип ассоциирован с пониженным риском развития СДС, т.е. он имеет протективный эффект ($\chi^2=2,7$, $p=0,2$, OR = 0,5, 95% CI: 0,21 - 1,15). Выявлена значимая ассоциация гетерозиготного генотипа G308A с риском формирования СДС, при его наличие вероятность выявления данной патологии вырастает в 2 раза. ($\chi^2=2,7$, $p=0,2$, OR=2,0, 95%:CI:0,46–2,22). Это свидетельствует о повышенной активности цитокина TNF- α при данной патологии.

Оценка уровня ассоциированности полиморфизма G308A в гене TNF- α у больных с нейроишемической формой СДС и группой контроля.

Оценка уровня ассоциированности полиморфизма G308A в гене TNF- α у больных с нейроишемической формой СДС выявила незначимое уменьшение частоты благоприятного аллеля G в исследуемой группе пациентов (91,8% против 94,6% в контрольной группе) и увеличение доминирующего, неблагоприятного аллеля A у больных с нейроишемической формой СДС по сравнению условно-здоровыми донорами (8,2% против 5,4%). У респондентов с нейроишемической формой СДС рассчитанный коэффициент отношения шансов показал, что при наличии благоприятного аллеля G отсутствует риск развития данного заболевания ($\chi^2=0,9$, $p=0,4$, OR=0,6, 95% CI:0,25–1,62), а наличие неблагоприятного аллеля A наоборот повышает вероятность выявления данной патологии в 1,6 раза ($\chi^2=0,9$, $P=0,4$, OR=1,6, 95% CI:0,65-7,73) (табл.4.23).

В исследованных группах пациентов с нейроишемической формой СДС и контроля гетерозиготный вариант генотипа G308A был выявлен в 16,4% и 10,8% случаях, а дикий генотип G308G был обнаружен соответственно в 83,6% и против 89,2% случаях. Как видно, частота дикого генотипа G308G среди больных с нейроишемической формой СДС оказалась

незначимо ниже, чем в контрольной группе (83,6% и 89,2% соответственно, при $\chi^2=0,9$, $p=0,4$, $OR=0,6$, 95% CI:0,24-1,62).

Таблица 4.23

Ассоциативная связь между полиморфизмом G308A в гене TNF- α в группе пациентов с нейроишемической формой СДС и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95% CI
	Нейро-ишемическая форма СДС		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
G	112	91,8	157	94,6	0,9	$p = 0,4$	0,6	0,25 - 1,62
A	10	8,2	9	5,4	0,9	$p = 0,4$	1,6	0,62 – 3,93
G / G	51	83,6	74	89,2	0,9	$p = 0,4$	0,6	0,24 - 1,62
G / A	10	16,4	9	10,8	0,9	$p = 0,4$	1,6	0,62 – 4,22

Выявлена предрасположенность к развитию нейроишемической формы СДС при обнаружении генотипа G308A, которая при его обнаружении увеличивается в 1,6 раза ($\chi^2=0,9$, $p=0,4$, $OR=1,6$, 95% CI:0,62–4,22).

Данные частоты распределения полиморфизма G308A в гене TNF- α у больных с нейропатической формой СДС и группой контроля

В данном исследовании нами было отмечено незначительное уменьшение частоты дикого аллеля G и умеренное повышение доли носительства неблагоприятного аллеля A у больных с нейропатической формой СДС, чем в группе контроля (87,1% и 94,6%, 22,6% и 17,3% соответственно) (табл. 4.24). Присутствие неблагоприятного аллеля A повышает вероятность возникновения нейропатической формы СДС в 2,6 раза ($\chi^2=3,9$, $p=0,05$, $OR=2,6$, 95% CI:1,00–6,61).

Частота выявления неблагоприятного гомозиготного генотипа G308G у больных с нейропатической формой СДС оказалась ниже, чем в контрольной группе (74,3% и 89,2% соответственно, при $\chi^2=4,2$, $p=0,05$, $OR=0,4$,

95%CI:0,13–0,95). Результаты анализов показывают, что выявление гетерозиготного генотипа G308A у больных с нейроишемической формой СДС была значимо выше (25,7% против 10,8% соответственно), чем в контрольной группе при $\chi^2=4,2$, $p=0,05$, OR=2,8, 95%CI:1,05–7,73 (таб.4.24).

Таблица 4.24

Ассоциативная связь между полиморфизмом G308A в гене TNF- α в группе пациентов с нейропатической формой СДС и контроля.

Аллели и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	P	OR	95%CI
	Без операции		Контрольная группа					
	n	%	n	%				
G	61	87,1	157	94,6	3,9	$p = 0,05$	0,4	0,15 - 1
A	9	12,9	9	5,4	3,9	$p = 0,05$	2,6	1 – 6,61
G / G	26	74,3	74	89,2	4,2	$p = 0,05$	0,4	0,13 – 0,95
G / A	9	25,7	9	10,8	4,2	$p = 0,05$	2,8	1,05 - 7,73

Таким образом, при наличии гетерозиготного генотипа G308A риск развития нейропатической формы СДС в 2.8 раза выше. При проведенном нами исследовании мутантный гомозиготный генотип A308A у больных нейропатической формой СДС выявлен не был.

Анализ частоты распределения полиморфизма G308A в гене TNF- α у больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС

Мы, для уточнения результатов, провели сравнительный анализ однонуклеотидного полиморфизма G308A в гене TNF- α в подгруппе пациентов с нейроишемической и нейропатической формами СДС получены следующие результаты.

В подгруппе больных с нейроишемической формой СДС благоприятный аллель G был выявлен у 91,8% пациентов, а неблагоприятный аллель A был обнаружен в 8,2% случаев. (таб.4.25).

Частота распределения полиморфизма G308A в гене TNF- α в группе больных с нейроишемической и нейропатической формами СДС.

Аллел и генотипы	Количество обследованных аллелей и генотипов				χ^2	p	OR	95%CI
	Нейроишемическая форма СДС		Нейропатическая форма СДС					
	N	%	n	%				
G	112	91,8	61	87,1	1,1	p = 0,3	1,7	0,64 – 4,25
A	10	8,2	9	12,9	1,1	p = 0,3	0,6	0,24 – 1,56
G / G	51	83,6	26	74,3	1,2	p = 0,3	1,8	0,64 – 4,85
G / A	10	16,4	9	25,7	1,2	p = 0,3	0,6	0,21 – 1,55

Частота распределения выше указанных аллелей показала незначительное различие между больными с нейроишемической и нейропатической формами СДС ($\chi^2=1,1$, p=0,3, OR=1,7, 95%CI:0,64-4,25 и $\chi^2=1,1$, p=0,3, OR=0,6, 95%CI:0,24-1,56) (таб.3.27). Затем, нами была изучена частота распределения полиморфных маркеров G308A в гене TNF- α в группе больных с ишемической и нейроишемической формами СДС.

Частоты распределения генотипов G308G, G308A у больных с нейроишемической формой имели незначительные различия по сравнению с пациентами страдающими нейропатической формами СДС (G308G – 83,6% и 74,3% соответственно, при $\chi^2=1,2$, p=0,3, OR=1,8, 95%CI:0,64-4,85, G308A – 16,4% и 25,7% соответственно, при $\chi^2=1,2$, p=0,3, OR=0,6, 95%CI:0,21-1,55).

По результатам анализа полученных результатов нами было установлено, что носительство генотипа G308G являлось предиктором дальнейшего развития нейропатической формы СДС в нейроишемическую форму СДС, повышая эту вероятность в 1,8 раза ($\chi^2=1,2$, p=0,3, OR=1,8, 95%CI:0,64-4,85).

Исходя из вышеизложенного, носительство аллеля A и генотипа G/A полиморфизма G308A в гене TNF- α повышает риск формирования у больных СДС ($\chi^2=2,5$, p=0,2, OR=1,9, 95%CI:0,85-4,31 и $\chi^2=2,7$, p=0,2,

OR=2,0, 95%CI:0,87-4,72). А присутствие у больных аллеля G и генотипа G/G полиморфизма G308A в гене TNF- α обеспечивает уменьшение риска формирования синдрома диабетической стопы ($\chi^2=2,5$, p=0,2, OR=0,5, 95%CI:0,23-1,17 и $\chi^2=2,7$, p=0,2, OR=0,5, 95%CI:0,21-1,15), это возможно связано с блокированием синтеза TNF- α и как следствие снижением уровня воспалительной реакции.

Полученные данные говорят о том, что характерной особенностью для СДС является наличие разнообразных генетических полиморфизмов, оказывающих влияние на основные этапы его патогенеза. Молекулярно-генетическое изучение этих нарушений имеет важное значение в повышении точности диагностики СДС. Эти сведения позволят значительно повысить достоверность диагностики этих заболеваний и способствовать раннему проведению профилактических мероприятий в предупреждении возможных сосудистых осложнений и индивидуализировать лечение каждого пациента.

На основании полученных результатов клинических, лабораторных и молекулярно-генетических исследований мы усовершенствовали алгоритм генетической диагностики у пациентов СДС, а также прогнозирования течения данного заболевания. Он позволяет сократить время, необходимое для установления своевременного и достоверного окончательного диагноза СДС (рис.4.6). В дебюте СДС пациенту рекомендовано исследование на носительство мутаций генов – влияющих на экспрессию провоспалительных цитокинов (IL6 C174G, TNF- α G308A) и фактора роста эндотелия сосудов VEGFA G634C с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выявление у пациента мутаций в исследуемых генах позволяет с большой достоверностью предсказать формирование у больного СДС. При выявлении у пациентов носительства одного полиморфизма генов IL6, TNF- α и VEGFA прогноз считается более благоприятным, чем при носительстве сочетания этих генетических мутаций.

Полученные результаты позволяют заключить, что широкая распространённость и очевидный неблагоприятный прогностический эффект выше указанных генетических мутаций подтверждает важность и необходимость включения этих молекулярных маркеров в алгоритм обследования пациентов с диагнозом СДС наряду с другими методами диагностики.

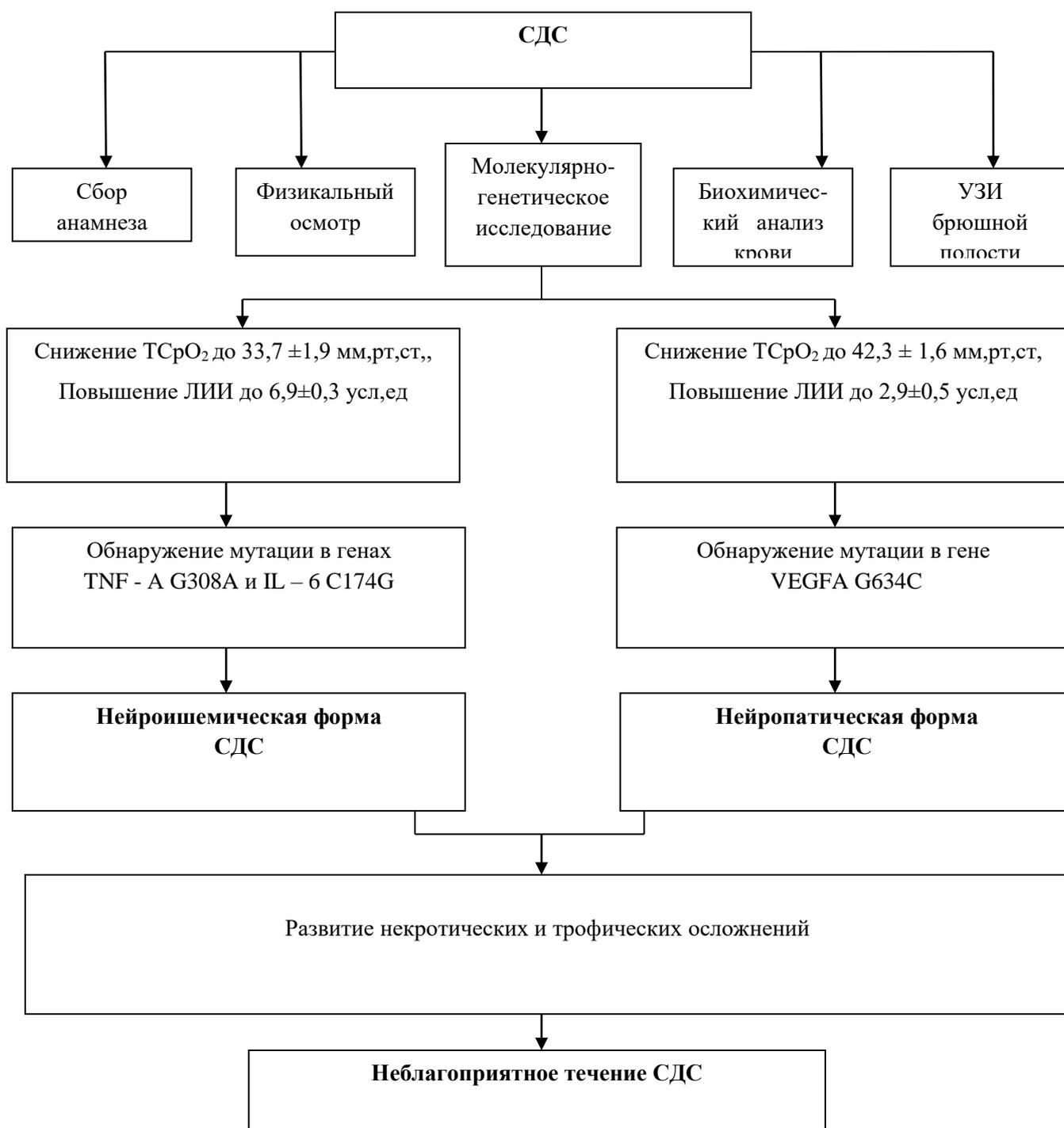


Рис. 4.6. Алгоритм генетической диагностики у пациентов СДС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы появились большие возможности диагностики СДС в зависимости от данных молекулярно-генетических исследований, которые дают возможность с большой достоверностью производить раннюю диагностику его развития и прогрессирования. В связи с большим значением генетических маркеров, как для достоверной диагностики, так и оценки риска возможных осложнений и риска прогрессирования данной патологии, настоящее исследование посвящено текущему пониманию молекулярной биологии СДС. Молекулярно-генетическое изучение мутаций генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFA) - rs2010963, интерлейкина – 6 (IL6) rs1800795 и фактора некроза опухоли – α (TNF - α) - rs1800629 имеют важное значение в повышении точности диагностики СДС. Однако, до сегодняшнего времени нету однозначного ответа на вопросы об их синергическом взаимодействии, роли в этиологии и патогенезе СДС, влияние на процессы ангиогенеза и поддержания хронического воспаления. Особенностью выполненной нами работы является комплексный подход к выявлению значения взаимодействия двух связанных между собой систем генов, провоспалительных цитокинов (IL6, TNF - α) и эндотелиального фактора роста сосудов (VEGFA), в формировании и прогрессии СДС. Осуществлена комплексная оценка роли полиморфизмов генов IL6, TNF – α и VEGFA, рассмотрено их взаимодействие в развитии предрасположенности для каждой отдельной клинической формы СДС.

В настоящем исследовании с учётом последних сведений о патогенезе заболевания, представлен усовершенствованный алгоритм раннего и достоверного выявления наличия у пациентов СДС с описанием всех этапов молекулярно-генетической диагностики. У 96 больных с СДС, обратившихся на обследование и дальнейшее лечение в клиники Андиганского Государственного медицинского института (клиники АГМИ) и Андиганский областной диспансер эндокринологических заболеваний (АОДЭЗ), проведена оценка диагностической значимости наиболее важных однонуклеотидных

полиморфизмов генов цитокинов, интерлейкина 6 IL6 C174G, фактора некроза опухоли – а TNF – G308A, а так же мутационный спектр гена эндотелиального фактора роста сосудов VEGFA G634C на шанс формирования и прогрессирования СДС. Оценена роль и значимость этих генетических маркеров в достоверной диагностике, прогнозировании развития и исхода синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом. В ходе нашего исследования пациентов основной группы было решено разделить на 2 подгруппы и рассматривать их отдельно во взаимосвязи с выявленными мутациями генов, оказывающих влияние на состояние ангиогенеза и процессов воспаления. Так была выделена группа с нейропатической формой СДС – 36 и нейроишемической формой СДС – 60 пациентов. Если выявление мутации изучаемого гена в исследуемой группе была значительно выше, чем в контрольной, то это расценивали как повышенный шанс выявления СДС. В этом случае, значительный результат ассоциации свидетельствовал о том, что изучаемый ген либо напрямую влияет на риск развития определённого заболевания или действует как генетический маркер для связанного генетического варианта, который оказывает воздействие на угрозу развития или рецидива данной патологии. Для исключения ложных положительных и ложных отрицательных результатов мы исследования генетических мутаций изучаемых генов проводили основываясь на соблюдении таких критериев, как адекватное количество обследованных лиц в исследуемых группах, соотношение полов, возраста и этнической совместимости больных и добровольцев из группы контроля. Высоко значимые ассоциации, которые были получены в ходе данного исследования, могут быть полезными для своевременной, достоверной диагностики и прогноза прогрессирования СДС.

Мутации в генах генов цитокинов, IL6 и TNF – α , имеют неоспоримое важное диагностическое значение. Обнаружение их носительства у пациентов подтверждает генетическую предрасположенность к возникновению заболевания и позволяет с большой вероятностью

предсказывать риск перехода СДС в тяжелые формы, которые в конечном итоге ведут к ампутации конечности и инвалидизации больных. Несмотря на современные достижения в молекулярной биологии прийти к единому мнению о диагностической значимости влияния этих генетических мутаций на патогенез СДС не представляется возможным. При СДС обнаруживается носительство и других генетических нарушений, например мутация гена VEGFA и др. Но, не выявлено специфичной для СДС, а их роль в патогенезе данной патологии активно изучается в научных работах.

В общей группе пациентов с СДС преобладали лица среднего (22 человек – 22,9%, из них мужчин было 15 – 68,2%, женщин 7 – 31,8%) и пожилого возраста (54 человек – 56,2 %, из них мужчин было 35 – 64,8%, женщин 19 – 35,2%). Среди обратившихся на обследование пациентов в возрасте старше 90 лет не было. Преобладание пациентов этих возрастных групп наблюдалось и во всех группах больных с СДС. Молодого возраста обратились 31 пациент - 32,3% (из них мужчин было 70,9%, женщин 29,1%). Относительно меньше было пациентов старческого возраста – 11,5%, из них мужчин было 72,7%, женщин 27,3%. Медиана возраста пациентов составила $60,8 \pm 1,2$ лет. Оценка наличия клинической симптоматики была проведена в начале заболевания. Клинические симптомы у больных СДС, включенных в настоящее исследование, показали, что наиболее часто у пациентов всех подгрупп отмечались следующие симптомы: боли - при нейропатической форме СДС – у 38,8%, нейроишемической форме СДС – у 86,7% пациентов. Нарушения чувствительности встречались чаще у больных при нейропатической формой СДС, чем при наличии нейроишемической формы СДС (91,7% и 15,0% случаях соответственно). Мышечные атрофии наоборот более часто встречались у больных с нейроишемической формой СДС – 63,3% и 25,0 % пациентов.

На этапе первичной диагностики СДС у пациентов с нейроишемической формой СДС, по отношению к больным с нейропатической формой СДС, наблюдались достоверно более высокие

показатели числа лейкоцитов ($12,9 \pm 0,8$ против $9,6 \pm 0,4$), уровня гликолизированного гемоглобина ($8,8 \pm 1,5$ против $7,3 \pm 0,9$) и значений ЛИИ ($6,9 \pm 0,3$ против $2,9 \pm 0,5$). У больных обеих групп количество тромбоцитов было практически одинаковым - $239,6 \pm 46,7 \times 10^9/\text{л}$ и $238,4 \pm 41,4 \times 10^9/\text{л}$.

Среди обследованных нами пациентов у больных с нейропатической формой СДС в основном были трофические поражения стоп 0-II ст. по шкале Wagner J.W - у 77,8% пациентов, тогда как при нейроишемической форме СДС трофические III-IV степени тяжести наблюдались у 64,9% больных.

В результате проведенных исследований, нами так же было установлено, что при перкутанном измерение напряжения кислорода (T_{cpO_2}) в пораженных конечностях имеется значимая разница в зависимости от формы СДС. Так у пациентов с нейротрофической формой СДС T_{cpO_2} составило $42,3 \pm 1,6$ мм,рт,ст., а у больных с нейроишемической формой СДС – $33,7 \pm 1,9$ мм,рт,ст.

Разнообразные данные, полученные в исследуемых группах, подтверждают гетерогенное происхождение СДС. Это проявляется уже на самом начале заболевания, на этапе постановки диагноза, что свидетельствует о важности и необходимости исследования с этой целью генетических нарушений для выявления у пациентов предрасположенности к формированию СДС до манифестации заболевания. Каждая нозологическая форма СДС может быть с большой точностью установлена только по результатам комплексной оценки клинических, лабораторных, а также молекулярно-генетических характеристик. Полученные нами данные клинических исследований позволяют расширить знания об особенностях течения СДС и раскрывают сложности диагностики этого заболевания, особенно на начальных этапах развития процесса. Различия в клинических проявлениях СДС объясняется его генетической разнообразностью.

Выше изложенное обосновывает важность и значение проведения качественной ПЦР на предмет обнаружения мутации в генах VEGFA, IL6, TNF - α . Исходя из этого следующим этапом исследования изучение

полиморфизмов генов эндотелиального фактора роста сосудов и провоспалительных цитокинов IL6 и TNF – α , а так же оценка их ассоциативной связи в патогенезе СДС у больных сахарным диабетом.

Последние исследования показали, что хроническое воспаление и дисрегуляция ангиогенеза играют важную роль в развитии сосудистых поражений при СД. Известно, что факторы роста и цитокины регулируют воспалительный ответ и ангиогенез; современные исследования этиологии и прогрессирования СДС позволяют предположить, что хроническое системное воспаление и aberrантный ангиогенез являются преобладающими механизмами в формировании СДС [55; с.109-116].

Исследования в этом направлении установили, что уровень экспрессии VEGFA имеет важное патогенетическое значение для развития и прогрессирования СДС. Ген VEGFA кодирует гепарин-связывающий белок, который существует в виде гомодимера, связанного дисульфидной связью. Этот фактор роста индуцирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов и необходим как для физиологического, так и для патологического ангиогенеза. Соответствующий анализ локуса G634C в гене VEGFA в исследованных группах пациентов с нейротрофической и нейроишемической формами СДС и контроля, как и во всех других полиморфизмах, был проведен при помощи дизайна «case-control». Проведён анализ χ^2 с вычислением отношения шансов, указывающий на вероятный шанс обнаружения синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом.

В основной группе больных и группе контроля доля дикого аллеля G полиморфизма G634C в гене VEGFA составила 75,5% и 89,2% соответственно. А неблагоприятный аллель C у больных с синдромом диабетической стопы был выявлен в 24,5% против 10,8% случаев в группе контроля. При статистической обработке анализов было обнаружено уменьшение частоты встречаемости благоприятного аллеля G ($\chi^2=11,1$, $p=0,01$, OR=0,4, 95% CI: 0,21 – 0,67) и значимое увеличение минорного аллеля

C ($\chi^2=11,1$, $p=0,01$, $OR=2,7$, $95\%CI:1,5-4,74$) в гене VEGFA (G634C) у больных в основной группе по сравнению с условно-здоровыми донорами. Это свидетельствует о том, что наличие неблагоприятного аллеля С повышает в 2.7 раза риск развития синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом по сравнению с группой контроля. При дальнейшем проведении генетических исследований в группе больных с нейроишемической формой СДС было выявлено, что при наличии неблагоприятного гетерозиготного генотипа G634C и гомозиготного генотипа C634C гена VEGFA есть тенденция к увеличению риска развития нейроишемической формой СДС в 2,6 раза и 3,6 раза по сравнению группой контроля (при $\chi^2=5,9$, $p=0,025$, $OR=2,6$, $95\%CI: 1,2-5,58$ и $\chi^2=2,5$, $p=0,2$, $OR=3,6$, $95\%CI: 0,75-17,54$ соответственно). У пациентов с нейропатической формами СДС исследования была обнаружена тенденция к увеличению частоты встречаемости неблагоприятного генотипа C634C гена VEGFA. При его присутствии риск развития и вероятность формирования нейропатической формы СДС при наличии данного маркера повышается на 3,8 раза по сравнению с контрольной группой ($\chi^2=2,3$, $p=0,2$, $OR=3,8$, $95\%CI:0,68-21,27$). Результаты анализов показывают, так же имеется тенденция к увеличению частоты встречаемости гетерозиготного маркера G634C у больных с нейроишемической формой СДС по сравнению с пациентами с нейропатической формой СДС. Степень различия в частоте распределения неблагоприятного маркера G634C у больных с нейроишемической формой СДС в 1,3 раза больше (34,4% и 28,6% соответственно, при $\chi^2=0,3$, $P=0,6$, $OR=1,3$, $95\%CI:0,53-3,24$), чем у пациентов с нейропатической формами.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что полиморфизм G634C (rs2010963) в гене VEGFA вовлечен в формирование и развитие синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом, наличие аллеля С и генотипов G634C и C364C полиморфизма G634C в гене VEGFA значительно повышает риск, а

обладание аллелем G и генотипом G634G снижает риск формирования СДС у больных сахарным диабетом. Различие в распределение не благоприятного маркера G634C у больных с нейропатической формой СДС по сравнению с нейроишемической свидетельствует о том, что в патогенезе последней играют большую роль грубые нарушения ангиогенеза, в основе которого лежит уменьшение экспрессии VEGFA. Подтверждением этих данных является так же то, что у больных с нейроишемической формой СДС имеется значительное, более чем в 1,5 раза, ухудшение показателей $TCpO_2$ по сравнению с пациентами с нейропатической формой – $33,7 \pm 1,9$ мм.рт.ст. против $42,3 \pm 1,6$ мм.рт.ст. Это приводит к формированию длительно незаживающих язвенных дефектов на конечности. которые встречаются у 100% изученных нами больных с нейроишемической формой СДС. Среди обследованных нами пациентов у больных с нейропатической формой СДС в трофические поражения стоп в основном были легкой (0-II ст.) формы по классификации Wagner J.W - 77,8%, тогда как при нейроишемической форме СДС преобладали гнойно-трофические поражения стоп средней и тяжелой (III-V ст.) степеней тяжести - 60,1%.

При СД 2 типа гипергликемия, постоянное рекрутирование воспалительных иммунных клеток и повышенная экспрессия воспалительных цитокинов (IL-6, IL-1, IL-8 и TNF- α), создают хроническую воспалительную среду и предотвращают переход воспалительной фазы в фазу репарации [157; с. 681-690, 145; с. 1565-1572.]. Стойкое воспаление не только удерживает раневой процесс в воспалительной фазе, но также отрицательно влияет на ангиогенез и образование грануляционной ткани, необходимых для правильного заживления [157; с. 681-690]. Цитокины являются ключевыми медиаторами межклеточных взаимодействий, в том числе в процессе воспаления [125; с.355-359].

Поэтому представляет большой интерес исследование однонуклеотидных полиморфизмов гена IL-6. Ген IL6 ген кодирует цитокин, который действует при воспалении и созревании В-клеток. Кроме того, было

показано, что кодируемый белок является эндогенным пирогеном, способным вызывать лихорадку у людей с аутоиммунными заболеваниями или инфекциями. Белок в основном вырабатывается в местах острого и хронического воспаления [86; с.62-67].

Нами было проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфизма С174G в гене IL6 у больных с СДС. Полученные нами результаты показали, что С и G аллели генетического маркера IL6 в основной группе выявлены с частотой соответственно 0,83/0,17. В контрольной группе это распределение было 0,88/0,12 соответственно. В исследованных группах пациентов с синдромом диабетической стопы и контрольной выборкой отмечена незначительная гетерогенность между фактически-наблюдаемыми и теоретически-ожидаемыми значениями генотипов полиморфного варианта С174G в гене IL6. В обеих изученных выборках неблагоприятный гомозиготный генотип G174G присутствовал в статистически незначимых количествах. Коррелятивный анализ локуса С174G в гене IL6 в исследованных группах пациентов с нейроишемическими и нейропатической формами СДС, а так же контроля проведён с анализом χ^2 с вычислением отношения шансов, указывающий на вероятный риск формирования различных форм СДС у больных сахарным диабетом. Статистическая обработка показала, что частота благоприятного аллеля С незначительно выше в основной группе по сравнению с контролем и его обнаружение не влияет на угрозу возникновения синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом (83,3% и 88,0% соответственно, при $\chi^2=1,5$, $p=0,3$, OR=0,7, 95% CI:0,38-1,25). Рассчитанный коэффициент отношения шансов показал, что при обнаружении функционального неблагоприятного аллеля G у пациентов был в 1,5 раза выше риск формирования СДС у больных сахарным диабетом по сравнению с представителями контрольной группы (16,7% и 12,0% соответственно, при $\chi^2=1,5$, $p=0,9$, OR=1,5, 95% CI:0,52-2,15). Выявлено увеличение доли носителей неблагоприятного гетерозиготного генотипа С174G в гене IL6 среди

больных по сравнению с группой контроля (соответственно 25,0% и 16,9%). При наличии данного генотипа присутствует угроза формирования синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом в 1,6 раза чаще ($\chi^2=1,8$, $p=0,2$, $OR=1,6$, $95\%CI:0,46-1,4$). Для уточнения уровня ассоциации был проведен сравнительный анализ полиморфизма C174G в гене IL6 в каждой подгруппе пациентов с синдромом диабетической стопы у больных сахарным диабетом. Дальнейшее исследование выявило, что при обнаружении гетерозиготного генотипа C174G шанс развития нейроишемической формы СДС увеличивается в 1,8 раза (при $\chi^2=1,9$, $p=0,2$, $OR=1,8$, $95\%CI:0,78-3,92$). А наличие гетерозиготного генотипа C174G гена IL6 незначимо, в 1,5 раза, повышает риск формирования нейропатической формы СДС ($\chi^2=0,4$, $p=0,6$, $OR=1,4$, $95\%CI:0,38-4,79$). При сравнительном анализе полиморфного маркера C174G в гене IL6 в подгруппе пациентов с нейроишемической и нейропатической формами СДС нами было выявлено, что носительство генотипа G174G повышало вероятность перехода нейропатической формы СДС в более тяжелую нейроишемическую форму в 1,8 раза (4,9% и 2,9 % соответственно, при $\chi^2=0,2$, $OR=1,8$, $95\%CI:0,18-17,11$, $p=0,9$). Аллель G и генотип C174G полиморфизма C174G гена IL6 имеет четкую корреляционную связь с предрасположенностью к развитию синдрома диабетической стопы. Носительство аллеля A и генотипа генотипа C174C полиморфизма C174G гена IL6 ассоциировано с протективным эффектом относительно формирования СДС, что связано с уменьшением выработки провоспалительного цитокина IL6.

Другим геном, являющимся регулятором цитокинового каскада является TNF- α . В исследовании, опубликованном в 2015 году Dhamodharan U. и соавторы [86; с.62-67]. было показано, что в дополнение к однонуклеотидному полиморфизму гена IL-6, генетический полиморфизм гена TNF- α rs1800629 способствует повышению риска развития СДС у больных сахарным диабетом.

Поэтому представляет интерес изучение роли генетических мутаций гена TNF- α в свете ассоциативного взаимодействия с полиморфизмами других генов цитокинов при формировании и прогрессировании СДС. Ген TNF- α кодирует многофункциональный провоспалительный цитокин, принадлежащий к надсемейству фактора некроза опухоли. Этот цитокин участвует в регуляции широкого спектра биологических процессов, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, метаболизм липидов и коагуляцию. Наша научная работа выявила, что распределение генотипических вариантов G308A (rs1800629) в гене TNF- α как в контрольной группе, так и в группах исследованных пациентов достигло равновесия Харди-Вайнберга (ХВ) ($p < 0.05$). В основной и контрольной группах частота распределения аллелей G и A генетического маркера rs1800629 в гене TNF- α были практически одинаковыми и составили соответственно в исследуемой группе - 0,9/0,1 и 0,95/0,05 в группе контроля. В основной группе пациентов и контроля доля дикого G аллеля составила 90,1% и 94,6% соответственно. А мутантный аллель A у больных с синдромом диабетической стопы был выявлен соответственно в 9,9% против 5,4% случаях. Носительство мутантного A аллеля ассоциировано с 1,9-кратным увеличением риска формирования СДС у больных сахарным диабетом по сравнению с представителями контрольной группы ($\chi^2=2,5$, $p=0,2$, OR=1,9, 95% CI:0,85-4,31). Коэффициент соотношения шансов показал, что наличие носительства генотипа G308G среди здоровых людей оказалось достоверно выше, чем у пациентов основной группы и данный генотип ассоциирован с пониженным риском развития СДС, т.е. он имеет протективный эффект ($\chi^2=2,7$, $p=0,2$, OR = 0,5, 95% CI: 0,21 - 1,15). Выявлена значимая ассоциация гетерозиготного генотипа G308A с риском формирования СДС, при его наличии вероятность выявления данной патологии вырастает в 2 раза ($\chi^2=2,7$, $p=0,2$, OR=2,0, 95% CI:0,46–2,22). Это свидетельствует о повышенной активности цитокина TNF- α при данной патологии. Интерес представляют данные частоты выявления генетических

мутаций в разрезе каждой нозологической формы СДС. В исследованных группах пациентов с нейроишемической формой СДС и контроля гетерозиготный вариант генотипа G308A был выявлен в 16,4% и 10,8% случаях, а дикий генотип G308G был обнаружен соответственно в 83,6% и против 89,2% случаях. Частота дикого генотипа G308G среди больных страдающих нейроишемической формой СДС оказалась незначимо ниже, чем в контрольной группе (83,6% и 89,2% соответственно, при $\chi^2=0,9$, $p=0,4$, OR=0,6, 95% CI:0,24-1,62). Выявлена предрасположенность к развитию нейроишемической формы СДС при обнаружении генотипа G 4682A, которая при его обнаружении увеличивается в 1,6 раза ($\chi^2=0,9$, $p=0,4$, OR=1,6, 95% CI:0,62-4,22). Присутствие неблагоприятного аллеля А повышает вероятность возникновения нейропатической формы СДС в 2,6 раза ($\chi^2=3,9$, $p=0,05$, OR=2,6, 95% CI:1,00-6,61).

Частота выявления неблагоприятного гомозиготного генотипа G308G среди больных, страдающих нейропатической формой СДС оказалась ниже, чем в контрольной группе (74,3% и 89,2% соответственно, при $\chi^2=4,2$, $p=0,05$, OR=0,4, 95% CI:0,13-0,95). Результаты анализов показывают, что выявление гетерозиготного генотипа G308A у больных с нейроишемической формой СДС была значимо выше (25,7% против 10,8% соответственно), чем в контрольной группе при $\chi^2=4,2$, $p=0,05$, OR=2,8, 95% CI:1,05-7,73. Таким образом, при наличии гетерозиготного генотипа G308A риск развития нейропатической формы СДС в 2,8 раза выше. Затем, нами была изучена частота распределения полиморфных маркеров G308G, G308A в гене TNF- α в группе больных с ишемической и нейроишемической формами СДС. Частоты распределения генотипов G308G, G308A у больных с нейроишемической формой имели незначительные различия по сравнению с пациентами страдающими нейропатической формами СДС (G308G – 83,6% и 74,3% соответственно, при $\chi^2=1,2$, $p=0,3$, OR=1,8, 95% CI:0,64-4,85, G308A – 16,4% и 25,7% соответственно, при $\chi^2=1,2$, $p=0,3$, OR=0,6, 95% CI:0,21-1,55).

По результатам анализа полученных результатов нами было установлено, что носительство генотипа G308G являлось предиктором дальнейшего развития нейропатической формы СДС в нейроишемическую форму СДС, повышая эту вероятность в 1,8 раза ($\chi^2=1,2$, $p=0,3$, $OR=1,8$, $95\%CI:0,64-4,85$). Таким образом, присутствие у больных СДС аллеля G и генотипа G308G в гене TNF- α обеспечивает уменьшение риска формирования синдрома диабетической стопы, это возможно связано с блокированием синтеза TNF- α и как следствие снижение уровня воспалительной реакции.

У больных с нейроишемической формой СДС наличие полиморфизмов G308A гена TNF- α и C174G в гене IL6 было напрямую связано с высоким уровнем лейкоцитов ($12,9\pm 0,8$ против $9,6 \pm 0,4$) и показателей ЛИИ ($6,9\pm 0,3$ против $2,9\pm 0,5$). Наряду с этим прослеживалась связь между влиянием высокой аллельной нагрузки и выраженностью клинических проявлений. Следует отметить, что мутации в генах цитокинов и эндотелиального фактора роста сосудов наиболее часто обнаруживались при СДС, в случаях, когда наступала быстрая прогрессия процесса с развитием гнойно-некротических осложнений СДС.

Следовательно, результаты нашего исследования подтверждают роль и место цитокинов в патогенезе СДС, которое они осуществляют посредством поддержания хронического воспалительного процесса, ведущего к нарушению процессов физиологического ангиогенеза и процессов восстановления поврежденных тканей. В свою очередь высокий уровень гликемии так же ведет к поддержанию этого процесса. У исследуемых нами пациентов уровень гликированного гемоглобина в крови у пациентов с нейроишемической формой СДС превышал его значения по сравнению с больными с нейропатологической формой СДС ($8,8\pm 1,5$ % и $7,3\pm 0,9$ % соответственно).

Выявление носительства всех этих генетических полиморфизмов подтверждает многофакторный характер патогенеза СДС. Вместе с тем

следует отметить, что при выявлении у пациентов носительства одного из них прогноз был более благоприятный, чем при носительстве сочетаний этих генетических нарушений.

Таким образом, медико-генетическое консультирование и предсимптомное тестирование ДНК особенно важно для людей с положительным семейным анамнезом на наличие сахарного диабета 2 типа, для выявления групп риска формирования СДС, что позволит снизить частоту осложненных форм СДС. Предварительное генетическое консультирование может помочь уменьшить беспокойство и заблуждение относительно фактов развития СДС. Молекулярно-генетическое исследование может сыграть значительную роль в ранней и достоверной диагностике СДС, если во время обычного сбора данных семейного анамнеза по сахарному диабету 2 типа во время консультирования по другим заболеваниям это позволит распознать людей с предрасположенностью к СДС, подверженных риску появления данного заболевания и проинформировать их о профилактических мерах, включая доступные молекулярные тесты. Если своевременно не принять необходимые меры по профилактике, носительство генетической наследственной склонности к СДС у пациентов с СД 2 типа может в дальнейшем стать причиной его развития и прогрессирования. Угрозу развития осложнений повышает не только общее количество задействованных генов, но важное значение имеют и отдельные генетические мутации, способные оказать большое влияние на развитие таких патологических состояний. Способность регулярно и надёжно выявлять генетическую предрасположенность людей к СДС может значительно способствовать ранней диагностике и сделать возможным раннее вмешательство, предотвращение различного рода осложнений, увеличивая тем самым продолжительность жизни и улучшения её качества. Людей с повышенным риском развития СДС лучше всего направить к эндокринологам, ангиохирургам, которые могут посоветовать некоторым из них пройти профилактическую специфическую терапию.

Молекулярная диагностика принесёт большую пользу, если будет лучше изучен относительный вклад каждого генетического маркера в развитие СДС, возможно, с помощью крупномасштабных эпидемиологических исследований. На этом этапе первоначальная информация о распространённости основных полиморфизмов ДНК рекомендуется для каждой популяции, чтобы сформировать местную политику в области здравоохранения для предотвращения сосудистых и гнойно-некротических осложнений путём выявления лиц, подверженных риску развития СДС. Поскольку генетическое тестирование становится рутинным подходом, ожидается, что оно будет широко использоваться как в больничной, так и в общественной профилактической медицине. Соответственно, можно предусмотреть, что осложнения СДС, которые в настоящее время является таким серьёзным глобальным бременем, можно будет регулярно предотвращать в будущем с помощью генетического тестирования и надлежащего лечения, тем самым сохраняя жизнь и состояние здоровья бессимптомных лиц, находящихся в группе риска развития СДС. Процесс выявления людей с предрасположенностью к СДС нуждается в дальнейшей корректировке путём исследования новых наследственных факторов. Поэтому дальнейшее изучение распространённости носительства генетических мутаций, оказывающих влияние на развитие и прогрессирование СДС с учётом популяционных и региональных особенностей представляет большой научный и практический интерес.

ВЫВОДЫ.

На основе проведенных научных исследований по теме: «Клинико-лабораторные и молекулярно-генетические аспекты патогенеза синдрома диабетической стопы у больных сахарным диабетом» сформулированы следующие выводы:

1. Установлено, что мутации генов IL – 6 C174G, TNF - A G308A и VEGFA G634C являются высокоспецифичными диагностическими маркерами формирования СДС, позволяющий не только точно установить диагноз, но и верифицировать вариант и прогнозировать клиническое течение заболевания.

2. В результате изучения распределения ДНК-полиморфизмов генов-цитокинов установлено:

- носительство неблагоприятного гетерозиготного генотипа C/G и дикого генотипа G/G полиморфизма C174G гена IL6 имеют четкую корреляционную связь с предрасположенностью к развитию синдрома диабетической стопы ($\chi^2=1,8$; $p=0,2$; OR=1,6 и $\chi^2=0,0$; $p=1,2$; OR=1,2);

- выявление аллеля A и гетерозиготного генотипа G/A полиморфизма G308A в гене TNF- α повышает риск формирования у больных СДС ($\chi^2=2,5$; $p=0,2$; OR=1,9 и $\chi^2=2,7$; $p=0,2$; OR=2,0).

3. Выявлено, что наличие генотипов G/C и C/C полиморфизма G634C в гене VEGFA в 2.6 и 3.6 раза повышает риск ($\chi^2=5,9$; $p=0,025$; OR=2,6 и $\chi^2=2,5$; $p=0,2$; OR=3,6) развития синдрома диабетической стопы.

4. Носительство генотипов G/C и C/C полиморфизма G634C в гене VEGFA взаимосвязано с резким снижением значений перкутанного напряжения кислорода (TspO₂) до $33,7 \pm 1,9$ мм.рт.ст, что свидетельствует о нарушении процессов ангиогенеза у больных СДС. Наличие генотипов C/G и G/G полиморфизма C174G гена IL6, а так же генотипа G/A полиморфизма G308A в гене TNF- α было ассоциировано с увеличением уровня ЛИИ до $6,9 \pm 0,3$ усл.единиц ($p < 0,05$). Это свидетельствует о повышенной активности цитокинов IL6 и TNF- α при СДС и прогрессирование воспалительного

процесса. У носителей выявленных генетических маркеров в 64,9% случаев наблюдались тяжелые трофические поражения III-IV степени по Wagner. Комбинация неблагоприятных генотипических вариантов генов VEGFA и цитокинов IL6, TNF- α является прогностически неблагоприятными маркерами прогрессирования СДС.

5. Усовершенствован алгоритм эффективной диагностики и прогнозирования клинического течения СДС с учётом исследованных полиморфизмов гена фактора роста эндотелия сосудов и генов цитокинов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. При первичном обращении пациентов для повышения точности установления диагноза СДС целесообразно применять комплексный подход, включающий одновременное использование лабораторных, инструментальных и молекулярно-генетических методов исследования.

2. Значительное количество пациентов с СДС, у которых были выявлены полиморфизмы генов цитокинов IL – 6 C174G, TNF- α G308A и эндотелиального фактора роста сосудов VEGFA G634C даёт основание считать их достоверными маркерами ранней диагностики СДС.

3. Учитывая, что риск развития СДС в большинстве случаев связан не с одним, а с несколькими генетическими нарушениями, целесообразным считается молекулярно-генетическое исследование не только на наличие полиморфизмов генов, влияющих на цитокиновый каскад, но и на мутации гена эндотелиального фактора роста сосудов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Абдуллаев С.А., Бабажанов А.С., Худайназаров У.Р., Шеркулов К.У. Синдром “диабетической стопы”: современная диагностика и тактика комплексного лечения //Проблемы биологии и медицины -2022. -№6.1 (141). -С. 14-16
2. Айтбаев К. А., Мамутова С. К., Муркамилов И. Т. Сахарный диабет 2 типа: роль эпигенетических модификаций в патофизиологии и перспективы использования эпигенетической терапии // Бюллетень науки и практики. – 2021. – Т. 7. № 5. – С. 184-203. DOI 10.33619/2414-2948/66/17. – EDN MMVTSD.
3. Алимов А.В., Хайдарова Ф.А., Исмаилов С.И. Экономически эффективная модель скрининга сахарного диабета 2-го типа в Республике Узбекистан // Вестник экстренной медицин. – 2021. - том 14(№3).-С.60-69
4. Алиханова Н.М. Клинико-эпидемиологическая характеристика сахарного диабета в Узбекистане. // Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. Ташкент. – 2018. -С.69.
5. Ахмедов Р.М., Сафоев Б.Б., Хамдамов Б.З. Усовершенствование методов местного лечения гнойно-некротических поражений при сахарном диабете. // Вестник врача. - 2018. -№4. – С. 16
6. Ахмедов Р.М., Хамдамов Б.З. Оценка способов ампутации на уровне голени при тяжелых формах синдрома диабетической стопы. // Биология ва тиббиёт муаммолари. Самарканд. 2019. -№4 (113). – С. 29-32.
7. Бабаджанов Б.Д., Матмуротов К.Ж., Моминов А.Т. Эффективность реконструктивных операций при нейроишемических язвах на фоне синдрома диабетической стопы // Узбекистон хирургияси. – 2020. - №1. – С. 86-91
8. Бабаджанов Б.Д., Матмуротов К.Ж., Саттаров И.С., Душамов И.Т., Сайтов Д.Н. Синдром диабетической стопы: современные взгляды и

- стратегия лечения// Вестник Ташкентской медицинской академии. – 2021. - № 2. – С.11-15
9. Бабажанов А.С., Худайназаров У.Р., Шеркулов К.У., Авазов А.А., Хамидов Ф.У. Тактика комплексного лечения сепсиса при сахарном диабете.// Журнал биомедицины и практики том 6. -2021. -№ 3. -С. 195-199
 10. Барановский Р. В., Абакумец В. Ю., Богданова Н. В., Буланова К. Я. Роль эпигенетической регуляции в сахарном диабете// Сахаровские чтения 2020 года: экологические проблемы XXI века: материалы 20-й международной научной конференции, 21–22 мая 2020 г., г. Минск, Республика Беларусь – Минск : ИВЦ Минфина, -2020. – Ч. 2. – С. 17-20.
 11. Белушкина Н. Н., Чемезов А. С., Пальцев М. А. Генетические исследования мультифакториальных заболеваний в концепции персонализированной медицины // Профилактика. медицина. – 2019. – Т. 3. – С. 26–30
 12. Биниенко М.А. Использование дермального эквивалента в комплексном лечении больных с синдромом диабетической стопы. // С.-Петербург. Автореф.дис кан.мед.наук. -2018. -С. 26
 13. Вербовой А.Ф., Пашенцева А.В., Вербовая Н.И. Диабетическая макроангиопатия. // Терапевтический архив. – 2019. -№91 (10). – С.139–143. DOI: 10.26442/00403660.2019.10.000109
 14. Вербовой А.Ф., Пашенцева А.В., Вербовая Н.И. Диабетическая макроангиопатия. // Терапевтический архив. – 2019. - №91 (10). – С.139–143. DOI: 10.26442/00403660.2019.10.000109
 15. Галстян Г. Р., Викулова О. К., Исаков М. А., Железнякова А. В., Серков А. А., Егорова Д. Н. Эпидемиология синдрома диабетической стопы и ампутаций нижних конечностей в Российской Федерации по данным Федерального регистра больных сахарным диабетом (2013–2016 гг.). // Сахарный диабет. – 2018. - №21 (3). – С.170–177. DOI: 10.14341 / DM9688

16. Галстян Г.Р., Токмакова А Ю., Егорова Д.Н. Клинические рекомендации по диагностики и лечению синдрома диабетической стопы.// общество с ограниченной ответственностью – 2015. - №2. – С.63-83.
17. Гудзь А.С., Зяблицев С.В., Захаревич Г.Е. "Влияние полиморфизмов rs2010963 и rs699947 гена VEGFA на клинические и лабораторные показатели при диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2-го типа" // Международный эндокринологический журнал, - Vol. 13, -No. 7, 2017,- P. 471-477
18. Дамдинов Р. И., Шаповалов К. Г., Троицкая Н. И. Роль «белков старости» и маркеров дисфункции эндотелия в развитии синдрома диабетической стопы. // Acta biomedica scientifica. – 2021. - №6 (3). – С.77–85. DOI: 10.29413 / ABS. 2021–6.3.8
19. Дедов И.И., Шестакова М.В. Осложнения сахарного диабета: лечение и профилактика: монография. Медицинское информационное агентство, Standards of Medical Care in Diabetes. Summary of Revisions.// Diabetes Care. -2017, -С. 744. DOI: 10.2337/dc17-S003.
20. Демидова Т.Ю., Зенина С.Г. Молекулярно-генетические особенности развития сахарного диабета и возможности персонализации терапии.// Сахарный диабет. - 2020 - №23(5). – С.467-474. <https://doi.org/10.14341/DM12486>
21. Жалалова Д.З., Норматова Н.М., Шерназаров Ф. Генетические маркеры развития диабетической ретинопатии // Science and Innovation. -2022. – Vol. 1 №(8).- С.919-923.
22. Зенина С.Г., Демидова Т.Ю. Молекулярно-генетические особенности развития сахарного диабета и возможности персонализации терапии // Сахарный диабет. — 2020. — Т. 23. — №5. — С. 467–474. DOI: <https://doi.org/10.14341/DM12486>

23. Исхакова А. Г. Роль генетических факторов риска в развитии диабетической ретинопатии // Вестн. мед. ин-та «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. – 2018. – Т. 5. - № 35. – С. 41–49.
24. Камалова Ф. Значение цитокинового звена при стоматологических заболеваниях у детей с сахарным диабетом 1-типа. //Журнал вестник врача – 2022. - № 1(4) – С. 20–22. <https://doi.org/10.38095/2181-466X-2020974-19-21>
25. Корейба К.А., Минабутдинов А.Р., Тушев Л.М. и др. Синдром диабетической стопы Стационарзамещающая методика на основе fast track-хирургии. //Амбулаторная хирургия. – 2019. - №(1– 2):72–79.] DOI: 10.21518/1995-1477-2019-1-2-72-79.
26. Крылов А. А. Современные подходы к лечению пациентов с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза при фоновом сахарном диабете. //Автореф.кан.мед.наук. Рязань –2018. - С 26.
27. Максименко Л.В. Эпигенетика как доказательная база влияния образа жизни на здоровье и болезни. // Профилактическая медицина. – 2019. - № 22(2). - С.115-120.
28. Миршарапов У., Содикова З., Ахмедова С., и Сагдуллаева М. «Проявления сосудистых осложнений при экспериментальном сахарном диабете». //Журнал проблемы биологии и медицины. – 2017 - № 2(94). – С.174-176
29. Орлова А. Ю., Артющкова Е. Б., Суковатых Б. С. Полиморфизм +936С>Т гена сосудистого эндотелиального фактора роста как маркер предрасположенности к облитерирующему атеросклерозу артерий нижних конечностей // Клин. медицина. – 2018. – № 3. – С. 234-239
30. Островский В.К., Макаров С.В., Янголенко Д.В. Показатели крови и лейкоцитарный индекс интоксикации при оценке тяжести течения и определении прогноза воспалительных, гнойных и гнойно-

- деструктивных заболеваний органов брюшной полости и легких // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2011. - № 1. – С. 73-78
31. Петрова О. Н., Пехтерева Т. В., Байракова С. М., Демченко О. В. Первичная инвалидность вследствие сахарного диабета с синдромом диабетической стопы в Орловской области // Медико-социальные проблемы инвалидности. – 2022. – № 1. – С. 27-33.
32. Плакса И.В. Генноопосредованная индукция ангиогенеза для коррекции диабетической нейропатии у пациентов с синдромом диабетической стопы. // Автореф. канд мед наук Рязань – 2019 г. - С 24.
33. Плакса И.Л., Мжаванадзе Н.Д., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Бакунов М.Ю., Кривихин В.Т., Матвеев С.А., Исаев А.А., Деев Р.В. Пилотное исследование безопасности и эффективности ангиогенной терапии при синдроме диабетической стопы. // Сахарный диабет. - 2019 - №22(6) - С.559-567.
34. Радайкина О.Г., Власов А.П., Мышкина Н.А. Роль эндотелиальной дисфункции в патологии сердечно-сосудистой системы // Ульян. медико-биол. журн. – 2018. – Т. 4. – С. 8–17.
35. Ремезов А.В. Этапное лечение гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы. С.П. Автор. дисс.канд.мед.наук. – 2020. - С.26
36. Русанов А.В., Чумаченко Ю.Д., Дубовик Ю.И., Харбузова В.Ю. Анализ ассоциации полиморфизма гена C936T VEGFA с синдромом диабетической стопы в украинской популяции// Научные результаты биомедицинских исследований. - 2019. - Т.5. - №2. - С. 34-42
37. Русинова Т.С. Частота встречаемости хронических осложнений у пациентов с сахарным диабетом // Смоленский медицинский альманах. – 2018. – № 2. – С. 94-97
38. Соколова Л.К. Сахарный диабет и атеросклероз: эпигенетические механизмы патогенеза. // Український кардіологічний журнал, -2017. - № 6 – С.104-115.

39. Сонис А. Г., Алексеев Д. Г., М. А. Безрукова. Оптимизация местного лечения раневых дефектов у пациентов с синдромом диабетической стопы // Междунар. науч.-исслед. журн. – 2017. – № 2-2. – С. 47-48.
40. Старостина Е.Г., Володина М.Н., Старостин И.В., Бобров А.Е. Депрессия и сахарный диабет как коморбидные заболевания // РМЖ. - 2017. -№ 22. - С. 1613–1620.
41. Степанова Т.В., Иванов А.Н., Терешкина Н.Е. Маркеры эндотелиальной дисфункции: патогенетическая роль и диагностическое значение (обзор литературы). // Клиническая лабораторная диагностика. - 2019. - №64(1) - С.34–41.
42. Стяжкина С. Н. Изучение ассоциаций полиморфных маркеров генов факторов некроза опухоли и их рецепторов: rs1800629 TNF_α, rs909253 Lt_α, rs767455 TNFR1, rs1061624 TNFR2 с формированием сахарного диабета 2 типа // Сахарный диабет. — 2017. — Т. 20. — № 3. — С. 166-171. DOI: 10.14341/2072-0351-5845
43. Стяжкина С.Н., Байрамкулов Э.Д., Кирьянов Н.А. Роль цитокинов в лечении синдрома диабетической стопы // International scientific review of the problems and prospects of modern science and education : Collection of scientific articles LVII International correspondence scientific and practical conference - 2019 г. - Boston, USA: PROBLEMS OF SCIENCE, - 2019. – С. 80-82
44. Сучкова О.В., Рудниченко В.А., Гурфинкель Ю.И. Оценка взаимосвязи микроциркуляторных нарушений и диабетической полинейропатии при сахарном диабете типа 2. Фактор гипергликемии в развитии сосудистых и невралгических расстройств Эндокринология: Новости. Мнения. Обучение. – 2017. –Т. 4. – № 21. – С. 104-113.
45. Токмакова А.Ю., Егорова Д.Н., Доронина Л.П. Поражения нижних конечностей при сахарном диабете.// Ожирение и метаболизм.- 2017. - №14(1) - С.41–47. DOI: 10.14341/omet2017141-47

46. Троицкая Н. И., Шаповалов К. Г., Мудров В. А. О взаимосвязи полиморфизмов генов VEGFA 634C>G и MMP9 8202A>G с маркерами дисфункции эндотелия и состоянием микроциркуляторного русла при сахарном диабете.// Регионарное кровообращение и микроциркуляция.- 2020. - №19(4) - С. 29–38. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-4-29-38.
47. Троицкая Н. И. Частота встречаемости полиморфизма A8202G гена MMP9 при развитии синдрома диабетической стопы. I ежегодная Научная сессия ФГБОУ ВО ЧГМА : Сборник научных трудов, Чита, 15 декабря 2022 года Под общей редакцией Н.В. Ларёвой. – Чита: Читинская государственная медицинская академия. – 2022. – С. 86-87. – EDN ZSSRD.
48. Троицкая Н.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А. Распространенность полиморфизмов генов факторов регуляции сосудистого тонуса, рецепторов тромбоцитов, ремоделирования сосудистой стенки и протромботических факторов при синдроме диабетической стопы Новости хирургии. - 2021 - Том 29 - № 5 – С.549-557
49. Троицкая Н.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А. Молекулярно-генетические полиморфизмы C786T гена eNOS и LYS198ASN гена END1 при синдроме диабетической стопы. Трансляционная медицина.- 2022. - №9(4) -С.13-19. DOI: 10.18705/2311-4495-2022-9-4-13-19.
50. Троицкая Н.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А. Анализ ассоциации полиморфизмов генов маркеров функции эндотелия и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза с развитием синдрома диабетической стопы. Acta biomedica scientifica. – 2021. - №6(4) – P.18-26. doi: 10.29413/ABS.2021-6.4.2
51. Филимонова Т. А., Каракулова Ю. В., Каракулов А. О. Васкулоэндотелиальный фактор роста в диагностике диабетической полинейропатии и профилактике синдрома диабетической стопы Медицинский альманах. – 2018. - №6(57). – С.134-136

52. Филимонова Т. А., Каракулова Ю. В., Каракулов А. О. Васкулоэндотелиальный фактор роста в диагностике диабетической полинейропатии и профилактике синдрома диабетической стопы.// Медицинский альманах. – 2018. - №6. – С.134-139
53. Хамдамов Б.З. Анализ изменений качества жизни больных после перенесенной высокой ампутации нижней конечности по поводу диабетической стоп. //Журнал проблемы биологии и медицины. – 2019. - №1 (107). – С.116–118
54. Хамдамов Б.З. Иммунопатогенетические аспекты прогнозирования исходов лечения синдрома диабетической стопы с критической ишемией нижних конечностей.// Автореф.дис док.мед.наук. - 2020. - С.73
55. Хрипун И.А., Хрипун А.В. Диагностическая «платформа» оценки эндотелиальной дисфункции у больных сахарным диабетом. - Медицинский вестник Юга России. – 2022 .- №13(1). – С.109-116. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2022-13-1-109-116>
56. Черников А.А., Северина А.С., Шамхалова М.Ш. Роль механизмов «метаболической памяти» в развитии и прогрессировании сосудистых осложнений сахарного диабета // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20. – № 2. – С. 126-134
57. Abdel-Moneim A., Mahmoud B., Nabil A. Correlation between oxidative stress and hematological profile abnormalities in diabetic nephropathy // Diabetes Metab Syndr. – 2019. – Vol. 13 (4). – P. 65-73.
58. Abdolmaleki F., Kovanen P.T., Mardani R., Gheibi-Hayat S.M., Bo S., Sahebkar A. Resolvins: Emerging Players in Autoimmune and Inflammatory Diseases. - Clin Rev Allergy Immunol. – 2020. -№58 – P.82-91.
59. Akbari M., Hassan-Zadeh. V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes.// Inflammopharmacology. – 2018. - №26 - P.685-698.

60. Al-Kharashi A.S. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy Saudi J Ophthalmol. – 2018. – Vol. 32. – P. 318-323.
61. American Diabetes, A. Economic Costs of Diabetes in the U.S.// *Diabetes Care*. – 2018. - №41- P.917–928.
62. Amoah V.M.K., Anokye R., Acheampong E., Dadson H.R., Osei M., Nadutey A. The experiences of people with diabetes-related lower limb amputation at the Komfo. // Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. - *BMC Res. Notes*. - 2018. - №11. - P.66.
63. Amoli M.M.,Hasani-Ranjbar S., Roohipour N. VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. //Diabetes Res Clin Pract. – 2011. -Vol. 93(2). – P. 215-219. doi: 10.1016/j.diabres.2011.04.016.
64. Angeloni, A., Bogdanovic, O. Enhancer DNA methylation: Implications for gene regulation. // *Essays Biochem*. – 2019. - №63. – P.707–715.
65. Babajanov A.S., Kurbanov E.Yu., Toirov A.S., Akhmedov A.I., Akhmedov G.K. Improved diagnosis and treatment of diabetic foot syndrome // XV international correspondence scientific specialized conference «international scientific review of the problems of natural sciences and medicine» (Boston. USA. December 4-5, 2019). - P. 64-77
66. Bhamidipati, T., Kumar, M., Verma, S. S., Mohanty, S. K., Kacar, S., Reese, D., Martinez, M. M., Kamocka, M. M., Dunn, K. W., Sen, C. K., & Singh, K. (2022). Epigenetic basis of diabetic vasculopathy. // *Frontiers in endocrinology*, - №13, - P. 989-844. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.989844>
67. Bönhof G J., C. Herder A., Strom N., Papanas M. “Emerging biomarkers, tools, and treatments for diabetic polyneuropathy,” // *Endocrine Reviews*. - 2019. -P. 153–192
68. Boniakowski AE., Kimball AS., Jacobs BN., Kunkel SL., Gallagher KA. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J Immunol*. – 2017. - №199(1).- P.17–24.

69. Buch A., Kaur S., Nair R. et al. Platelet volume indices as predictive biomarkers for diabetic complications in type 2 diabetic patients // *J Lab Physicians.* – 2017. – Vol. 9. – P. 84–88
70. Campion C.G., Sanchez-Ferraz O., Batchu S.N. Potential Role of Serum and Urinary Biomarkers in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Nephropathy // *Can. J. Kidney Health Dis.* – 2017. – Vol. 4. – P. 205-211
71. Carvalho, C.R., Oliveira, J.M., Reis, R.L. Modern Trends for Peripheral Nerve Repair and Regeneration: Beyond the Hollow Nerve Guidance Conduit. *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. - №7. – P.337.
72. Cavazanna, I., Viswanathan V. Role of molecular genetics in diabetic foot ulcer. // *Polish Archives of Internal Medicine.* – 2017. - 127. – P.310-311. 10.20452/pamw.4036.
73. Cavazzana S., Piantoni E., Sciatti I. et al. Relationship between endothelial dysfunction, videocapillaroscopy and circulating CD3+CD31+CXCR4+ lymphocytes in systemic lupus erythematosus without cardiovascular risk factors // *Lupus.* – 2019. – Vol. 28. – P. 210-216
74. Chakraborty R., Borah P., Dutta PP., Sen S. Evolving spectrum of diabetic wound: Mechanistic insights and therapeutic targets. // *World J Diabetes.* – 2022. - №13(9). - P.696-716. DOI:10.4239/wjd.v13.i9.696
75. Charlotte Ling., Tina Rönn. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes *Cell Metabolism.* - Vol.29(5) – 2019. - P 1028-1044, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>.
76. Chen Z., Miao F., Paterson A.D., J.M. Lachin L. et al. Epigenomic profiling reveals an association between persistence of DNA methylation and metabolic memory in the DCCT/EDIC type 1 diabetes cohort.// *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 113. -2016 - P. 102-111
77. Chen K., Vigliotti A., Bacca M., McMeeking R.M., Deshpande V.S., Holmes J.W. Role of boundary conditions in determining cell alignment in response to stretch. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2018. - №115. – P.986–991.

78. Čugalj Kern B., Trebušak Podkrajšek K., Kovač J., Šket R., Jenko Bizjan B., Tesovnik T., Debeljak M., Battelino T., Bratina N. The Role of Epigenetic Modifications in Late Complications in Type 1 Diabetes. // *Genes*. – 2022. - №13. – P.705. <https://doi.org/10.3390/genes13040705>
79. Cui J., Zhang X., Guo C., Zhang L. - The association of interleukin-6 polymorphism (rs1800795) with microvascular complications in Type 2 diabetes mellitus. // *Biosci Rep*. – 2020. - №40.
80. da Silva Novaes A., Borges FT., Maquigussa E., Varela VA., Dias MVS., Boim MA. Influence of high glucose on mesangial cell-derived exosome composition, secretion and cell communication. // *Sci Rep*. – 2019. - №9. – P.62-70.
81. Dahlan M. K., Dedy P., Muradi A. Association of vascular endothelial growth factor gene +405 C>G and -460 C>T polymorphism with diabetic foot ulcer in Indonesia//*Journal of Physics: Conference Series*. – 2019 -№1 – P.12-46
82. Davlatov S.S. "THE REVIEW OF THE FORM OF NEUROPATHIC DIABETIC FOOT" // *Вопросы науки и образования*, no. 24 (149), -2021, - P. 28-42
83. Dehdashtiana E., Mehrzadib S., Yousefi B. et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin, involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress // *Life Sciences*. – 2018. – Vol. 193. – P. 20-33.
84. Demirdal T., Sen P. The significance of neutrophil-lymphocyte ratio, platelet-lymphocyte ratio and lymphocyte-monocyte ratio in predicting peripheral arterial disease, peripheral neuropathy, osteomyelitis and amputation in diabetic foot infection. // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2018. - №144. – P.118–125
85. den Dekker A., Davis F. M., Kunkel S. L., & Gallagher K. A. (2019). Targeting epigenetic mechanisms in diabetic wound healing. // *Translational*

research : the journal of laboratory and clinical medicine. – 2018. - №204. – P.39–50. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.10.001>

86. Dhamodharan U., Viswanathan V., Krishnamoorthy E., Rajaram R., Aravindhan V. Genetic association of IL-6, TNF- α and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. // *Gene*. - 2015. - №65. – P.62-67.
87. Dhawan P., Vasishta S., Balakrishnan A., Joshi M.B. Mechanistic insights into glucose induced vascular epigenetic reprogramming in type 2 diabetes. // *Life Sci*. – 2022.- №298. – P.120. DOI:10.1016/j.lfs.2022.120490
88. Dimova R., Tankova T., V. Guergueltcheva et al. “Risk factors for autonomic and somatic nerve dysfunction in different stages of glucose tolerance,” // *Journal of Diabetes and its Complications*, - Vol. 31. -N 3 -P. 537–543, 2017
89. Doğruel H., Aydemir M., Balci MK. Management of diabetic foot ulcers and the challenging points: An endocrine view. // *World J Diabetes*. – 2022. - №13(1). – P.27-36. doi: 10.4239/wjd.v13.i1.27. PMID: 35070057, PMCID: PMC8771264.
90. Erdogan M., Kulaksizoglu M., Solmaz S., Berdeli A. The relationship of Interleukin-6 -174 G>C gene polymorphism in type 2 diabetic patients with and without diabetic foot ulcers in Turkish population. // *Foot (Edinb)*. – 2017. - №30. – P.27-31.
91. Fallah A., Sadeghinia A., Kahroba H., Samadi A., Heidari H.R., Bradaran B., Zeinali S., Molavi O. Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. // *Biomed. Pharmacother*. – 2019. - №110. – P.775–785.
92. Federation I. IDF Diabetes Atlas, 9th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019 Barnes J. A., Eid M.A., Creager M.A., Goodney P.P. Epidemiology and Risk of Amputation in Patients With Diabetes Mellitus and Peripheral Artery Disease. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2020. - №40. – P.1808-1817.

93. Feldman E. L., Callaghan B. C., R. Pop-Busui et al. “Diabetic neuropathy,”
Nature Reviews Disease Primers. -2019. - vol. 5, - P. 42
94. Fishchuk L., Rossokha Z., Pokhylko V., Cherniavska Y., Tsvirenko S., Kovtun S., Medvedieva N., Vershyhora V., Gorovenko N. Modifying effects of TNF- α , IL-6 and VDR genes on the development risk and the course of COVID-19. // Pilot study. Drug Metab Pers Ther. – 2021. - №37. – P.133-139.
95. Fouad, M., Salem, I., Elhefnawy, K., Raafat, N., Faisal, A. microRNA-21 as an Early Marker of Nephropathy in Patients with Type 1 Diabetes.// Indian J. Nephrol. – 2020. -№30. – P.21–25.
96. Galicia-Garcia U., Benito-Vicente A., Jebari S., Larrea-Sebal A., Siddiqi H., Uribe K. B., Ostolaza H., & Martín C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. // *International journal of molecular sciences*. -2020. - №21(17). – P.62-75. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
97. Gao L., Liesveld J., Anolik J., Mcdavid A., Looney R.J. IFN β signaling inhibits osteogenesis in human SLE bone marrow.// *Lupus*. – 2020. -№29. – P.1040–1049.
98. Hall E., Dekker M., Volkov P. et al. The effects of high glucose exposure on global gene expression and DNA methylation in human pancreatic islets //Mol. Cell. Endocrinol. – 2018. - Vol.472 – P. 57-67
99. Hanna R.M., Barsoum M., Arman F. et al. Nephrotoxicity induced by intravitreal vascular endothelial growth factor inhibitors: emerging evidence // *Kidney Int*. - 2019. – Vol. 96 (3). – P. 572-580
100. Hongkui W., Hui Z., Qi G. Overlapping mechanisms of peripheral nerve regeneration and angiogenesis following sciatic nerve transection W. Hongkui // *Front Cell Neurosci*. — 2017. — Vol. 11. — P. 323
101. Hou Y., Bai L., Jiang N., Yao Z., Xue L., Yu B. Screening of TNF- α gene polymorphisms in patients with extremity chronic osteomyelitis in China. // *Per Med*. – 2018. - №15. – P.395-401.

102. Hu Y., Tao R., Chen L., et al. Exosomes derived from pioglitazone-pretreated MSCs accelerate diabetic wound healing through enhancing angiogenesis. // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2021. - №19(1). - p.150.
103. Hu Y.J., Song C.S., Jiang N. Single nucleotide variations in the development of diabetic foot ulcer: A narrative review. // *World J Diabetes*. – 2022. - №13(12). – P.1140-1153 DOI: [10.4239/wjd.v13.i12.1140](https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i12.1140)
104. Hu Y. J., Song C. S., & Jiang, N. (2022). Single nucleotide variations in the development of diabetic foot ulcer: A narrative review. // *World journal of diabetes*, - №13(12) - P.1140–1153. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i12.1140>
105. Hugo Montes A., Valle-Garay E., Martin G., Collazos J., Alvarez V., Meana A., Pérez-Is L., Carton JA., Taboada F., Asensi V. The TNF- α (-238 G/A) polymorphism could protect against development of severe sepsis. // *Innate Immun*. – 2021. - №27. – P.409-420.
106. Hwang D.J., Lee K.M., Park M.S., Choi S.H., Park J.I., Cho J.H., Park K.H., Woo S.J. Association between diabetic foot ulcer and diabetic retinopathy. // *PLoS One*. – 2017. - №12. – e.0175270
107. Insuela D., Coutinho D., Martins M., Ferrero M., Carvalho, V. Neutrophil Function Impairment Is a Host Susceptibility Factor to Bacterial Infection in Diabetes. // In *Cells of the Immune System*, IntechOpen: London, UK, 2020
108. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 8th ed. Brussels: IDF. – 2017. - №148
109. Irace C., Messiniti V., Tassone B. et al. Evidence for congruent impairment in micro and macrovascular function in type 1 diabetes// *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 11. – P. e0187525
110. Januszyk M., Chen K., Henn D., Foster DS., Borrelli MR., Bonham CA., Sivaraj D., Wagh D., Longaker MT., Wan DC., Gurtner GC. Characterization of Diabetic and Non-Diabetic Foot Ulcers Using Single-Cell RNA-Sequencing. // *Micromachines*. – 2020. - №11(9). – P.815. <https://doi.org/10.3390/mi11090815>

111. Jeon B. J., Choi H. J., Kang J. S., Tak M. S., & Park, E. S. Comparison of five systems of classification of diabetic foot ulcers and predictive factors for amputation. // International wound journal. - 2017 - №14(3), P.537–545. <https://doi.org/10.1111/iwj.12642>
112. Jhamb S., Vangaveti V.N., Malabu U.H. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. J Tissue Viability. – 2016. - №25(4). – P.229-236. doi:10.1016/j.jtv.2016.06.005
113. Jia Y., Reddy M.A., Das S., Oh H.J., Abdollahi M., Yuan H., Zhang E., Lanting L., Wang M., Natarajan R. Dysregulation of histone H3 lysine 27 trimethylation in transforming growth factor- β 1-induced gene expression in mesangial cells and diabetic kidney.// J. Biol. Chem. – 2019. - №294. – P.126–127.
114. Kartika R.W., Alwi I., Suyatna F.D. et al. The role of VEGF, PDGF and IL-6 on diabetic foot ulcer after Platelet Rich Fibrin hyaluronic therapy. //Heliyon. – 2021. - №7(9). doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07934
115. Kartika R.W., Alwi I., Suyatna F.D. et al. The role of VEGF, PDGF and IL-6 on diabetic foot ulcer after Platelet Rich Fibrin hyaluronic therapy. //Heliyon. – 2021. - №7(9) - P. 14-16 doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07934
116. Khamdamov B. Z., Islomov A. A., Jabborova N. J., Khamdamov I. B. and Khamdamov A. B. "Method of prevention of postoperative complications of surgical treatment of diabetic foot syndrome" European science review. – 2018. - P. 194-196
117. Khamdamov B.Z. Indicators of immunocytocine status in purulent-necrotic lesions of the lower extremities in patients with diabetes mellitus. // American Journal of Medicine and Medical Sciences. - 2020 -№10(7). – P.473-478.
118. Khamdamov B.Z. Comparative evaluation of methods of amputation related to tidiotarus with severe forms of diabetic foot syndrome// European Science Review. Austria, Vienna, 2014. Septemba-October. № 9-10. P. 58-60

119. Khamdamov B.Z., Akhmedov R.M., Khamdamov A.B. The use of laser photodynamic therapy in the prevention of purulent-necrotic complications after high amputations of the lower limbs at the level of the lower leg in patients with diabetes mellitus// Scopus Preview. International journal of Pharmaceutical Research, - 2019. - Volume 11. - P. 193-196
120. Khamdamov B.Z., Islomov A.A., Khamdamov A.B., Baymuradov R.R., Khamdamov I.B. Comparative analysis of the results of various methods of amputation at the shin level in severe purulent-necrotic lesions of the lower extremities against the background of diabetes mellitus. // 3rd International Scientific and Practical Congress "Diabetes Mellitus and Surgical Infections". Moscow, - 2017. - P. 87-88
121. Kimball A.S., Joshi A., Carson W.Ft., Boniakowski A.E., Schaller M., Allen R. et al. The Histone Methyltransferase MLL1 Directs Macrophage-Mediated Inflammation in Wound Healing and Is Altered in a Murine Model of Obesity and Type 2 Diabetes. // Diabetes. – 2017. - №66(9). – P.59–71.
122. Kowluru R.A., Mishra M. Therapeutic targets for altering mitochondrial dysfunction associated with diabetic retinopathy// Expert Opin Ther Targets. – 2018. – Vol. 22. – P. 233-245
123. Kurbanov O.M., Sharapova M.S., Zulfikorov A.N. & Muhammad Iev I.S. Protein metabolism disorders in patients with purulent wounds with thyrotoxicosis against diabetes mellitus. // International Journal of Current Research and Review. – 2020. - №12(24). – P.135-139. DOI:10.31782/IJCRR.2020.122427
124. La Mendola D., Trincavelli ML., Martini C. Angiogenesis in Disease. // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. - №23(18). - P.109-112. <https://doi.org/10.3390/ijms231810962>
125. Lavery LA., Oz OK., Bhavan K., Wukich DK. Diabetic Foot Syndrome in the Twenty-First Century. // Clin Podiatr Med Surg. – 2019. - №36(3). - P.355-359. doi: 10.1016/j.cpm.2019.02.002.

126. Li M., Wang T., Tian H., Wei G., Zhao L., Shi Y. Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model. // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* – 2019. - №47. – P.37-43.
127. Li X. The association between MCP-1, VEGF polymorphisms and their serum levels in patients with diabetic foot ulcer. *Medicine*, - 2018. - №97(24), – P.106-135. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000010959>
128. Li X. The association between MCP-1, VEGF polymorphisms and their serum levels in patients with diabetic foot ulcer. // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. -№97(24). – P.28-35. Doi: 10.1097 / MD.0000000000010959
129. Li X., Lu Y., Wei P. Association between VEGF genetic variants and diabetic foot ulcer in Chinese Han population. // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. - №97(20). – P.10672. Doi: 10.1097 / MD.0000000000010672
130. Littig J.P.B., Moellmer R., Agrawal D.K., Rai V. Future applications of exosomes delivering resolvins and cytokines in facilitating diabetic foot ulcer healing. // *World J Diabetes*. – 2023. - №14(1). – P.35-47 PMID: [36684384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36684384/) DOI: [10.4239/wjd.v14.i1.35](https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i1.35)]
131. Liu Y., Li H., Liu J., Han P. et al. Variations in MicroRNA-25 expression influence the severity of diabetic kidney disease. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2017. - №28. – P.36-45.
132. Mahmoudi S., Mancini E., Xu L., Moore A., Jahanbani F., Hebestreit K., Srinivasan R., Li X., Devarajan K., Prelot L. et al. Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nature*. – 2019. - №574. – P.553–558.
133. Massignam E.T., Dieter C., Pellenz F.M., Assmann T.S., Crispim D. Involvement of miR-126 rs4636297 and miR-146a rs2910164 polymorphisms in the susceptibility for diabetic retinopathy: A case–control study in a type 1 diabetes population. // *Acta Ophthalmol.* – 2021. - №99. – P.461–469.

134. Melamed P., Yosefzon Y., David C., Tsukerman A., Pnueli L. Tet enzymes, variants, and differential effects on function. // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2018. - №6. – P.22.
135. Meyr A.J., Seo K., Khurana J.S., Choksi R., Chakraborty B. Level of Agreement With a Multi-Test Approach to the Diagnosis of Diabetic Foot Osteomyelitis. // *J. Foot Ankle Surg.* – 2018. - №57. – P.1137–1139.
136. Muhammad Ibrahim A. Diabetic Foot Ulcer: Synopsis of the Epidemiology and Pathophysiology. *Int. J. Diabetes Endocrinol.* – 2018. - №3. – P.23. doi: 10.11648/j.ijde.20180302.11.
137. Onger M.E., Delibaş B., Türkmen A.P., Erener E., Altunkaynak B.Z., Kaplan S. The role of growth factors in nerve regeneration M.E.Önger // *Drug Discov Ther.* — 2017. — Vol.10(6). — P. 285 — 291
138. Pastar I., Marjanovic J., Liang L. et al. Cellular reprogramming of diabetic foot ulcer fibroblasts triggers pro-healing miRNA-mediated epigenetic signature. // *Exp Dermatol.* – 2021. - № 30. – P.1065–1072. <https://doi.org/10.1111/exd.14405>
139. Phase 2b study of GAM501 in the treatment of diabetic ulcers of the lower extremities (MATRIX) [Internet]. [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), - 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00493051>
140. Ping Y., Xiao S., Zeng-Wei Kou, Kun W. W., Ya-Lin H., Feng-Yan S. VEGF Axonal Transport Dependent on Kinesin-1B and Microtubules Dynamics. Ping Y. // *Front Mol Neurosci.* — 2017. — Vol.10. — P. 424
141. Ponirakis G., Elhadd T., Chinnaiyan S., Dabbous Z., Siddiqui M., Al-Muhannadi H., Petropoulos I.N., Khan A., Ashawesh K.A.E., Dukhan K.M.O. et al. Prevalence and management of diabetic neuropathy in secondary care in Qatar. // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2020. - №36. – P.32-42.
142. Porta M., Amione C., Barutta F., et al. The co-activator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) gene is overexpressed in type 2

- diabetes. *Endocrine*. – 2019. - №63(2). – P.284-292. doi:10.1007/s12020-018-1740-z
143. Qian L., Xia Z., Zhang M., et al. Integrated Bioinformatics-Based Identification of Potential Diagnostic Biomarkers Associated with Diabetic Foot Ulcer Development. // *J Diabetes Res*. - 2021,2021:5445349. Published - 2021 Aug 31. doi:10.1155/2021/5445349
144. Raghav, A., Khan Z.A., Labala R.K., Ahmad J., Noor S., Mishra B.K. Financial burden of diabetic foot ulcers to world: A progressive topic to discuss always. // *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* – 2018. - №9. – P.29–31.
145. Rai V., Moellmer R., Agrawal DK. The role of CXCL8 in chronic nonhealing diabetic foot ulcers and phenotypic changes in fibroblasts: a molecular perspective. // *Mol Biol Rep*. – 2022. - №49. – P.1565-1572.
146. Rakhmatillaevna K.F. Diagnostic value of salivator cytokines in dental diseases in children with diabetes mellitus type 1. // *European Journal of Molecular and Clinical Medicine*. - 2020 - №7(3). - P.1518-1523. Retrieved from www.scopus.com.
147. Ramsey DJ., Kwan JT., Sharma A. Keeping an eye on the diabetic foot: The connection between diabetic eye disease and wound healing in the lower extremity. // *World J Diabetes*. – 2022. - №13(12). – P.1035-1048. doi:10.4239/wjd.v13.i12.1035
148. Rodríguez-Carrizalez A.D., Castellanos-González J.A., Martínez-Romero E.C. et al. The effect of ubiquinone and combined antioxidant therapy on oxidative stress markers in non-proliferative diabetic retinopathy: a phase IIa, randomized, double-blind, and placebo-controlled study // *Redox Rep*. – 2018. – Vol. 21. – P. 155-163
149. Rubitschung K., Sherwood A., Crisologo A.P. et al. Pathophysiology and Molecular Imaging of Diabetic Foot Infections.// *Int. J. Mol. Sci.* -2021.- Vol. 22. – P. 11-21. <https://doi.org/10.3390/ijms222111552>

150. Ruiz-Bedoya C.A., Gordon O., Mota F., Abhishek S., Tucker E.W., Ordonez A.A., Jain S.K. Molecular imaging of diabetic foot infections: New tools for old questions. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. - №20. – P.59-84
151. Saik O. V., Klimontov V. V. Bioinformatic reconstruction and analysis of gene networks related to glucose variability in diabetes and its complications. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. - №21(22). - P. 86-91.
152. Saltoglu N., Ergonul O., Tulek N., Yemisen M., Kadanali A., Karagoz G., Batirel A., Ak O., Sonmezer C., Eraksoy H., et al. Influence of multidrug resistant organisms on the outcome of diabetic foot infection.// *Int. J. Infect. Dis.* – 2018. - №70. – P.10–14.
153. Saluja S., Anderson S. G., Hambleton I. et al. “Foot ulceration and its association with mortality in diabetes mellitus: a metaanalysis,” // *Diabetic Medicine*, - 2020. - vol. 37. - No. 2. -Pp. 211–218,
154. Sanz-Corbalán I., Lázaro-Martínez J.L., García-Morales E., Molines-Barroso R., Álvaro-Afonso F., García-Álvarez Y. Advantages of early diagnosis of diabetic neuropathy in the prevention of diabetic foot ulcers. // *Diabetes Res Clin Pract.* - 2018. - №146. – P.148-154. doi: 10.1016/j.diabres.2017.12.018
155. Sellami N. Association of VEGFA variants with altered VEGF secretion and type 2 diabetes: A case-control study // *Cytokine.* - 2018. - Vol. 106. - P. 29-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.003>
156. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest.* - 2018. - №128. – P.26-57
157. Shofler D., Rai V., Mansager S., Cramer K., Agrawal DK. Impact of resolvins mediators in the immunopathology of diabetes and wound healing. // *Expert Rev Clin Immunol.* – 2021. - №17. – P.681-690.
158. Sima C., Paster B., Van Dyke TE. Function of Pro-Resolving Lipid Mediator Resolvin E1 in Type 2 Diabetes. // *Crit Rev Immunol.* – 2018. - №38. – P.343-365.

159. Skrepnek GH., Mills J.L., Lavery L.A., Armstrong D.G. Health care service and outcomes among an estimated 6.7 million ambulatory care diabetic foot cases in the US. // *Diabetes Care*. – 2017. - №40(7). – P.936-942. doi: 10.2337/dc16-2189
160. Sové R.J., Goldman D., Fraser G.M. A computational model of the effect of capillary density variability on oxygen transport, glucose uptake, and insulin sensitivity in prediabetes// *Microcirculation*. – 2017. – Vol. 24. – № 2. – P. 12-34.
161. Spallone V., “Update on the impact, diagnosis and management of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: what is defined, what is new, and what is unmet,” // *Diabetes and Metabolism Journal*. – 2019 - vol. 43, - No. 1. - Pp. 3–30.
162. Spallone V., Ciccacci C., Latini A., and Borgiani P. What Is in the Field for Genetics and Epigenetics of Diabetic Neuropathy: The Role of MicroRNAs// *Journal of Diabetes Research*, vol. -2021. - pages 10 - P.57-68. ID 5593608<https://doi.org/10.1155/2021/5593608>
163. Standards of Medical Care in Diabetes Summary of Revisions. // *Diabetes Care*. – 2017. - №40. - P.507-518. DOI: 10.2337/dc17-S003.
164. Subramanian S., Pallati PK., Rai V., Sharma P., Agrawal DK., Nandipati KC. Increased expression of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in the population with obesity and insulin resistance. // *Obesity (Silver Spring)*. – 2017. - №25. - P.527-538.
165. Takematsu E., Spencer A., Auster J., et al. Genome wide analysis of gene expression changes in skin from patients with type 2 diabetes. // *PloS One*. – 2020. - №15. – P.61-72.
166. Teo ZL., Tham YC., Yu M., Chee ML., Rim TH., Cheung N., Bikbov MM., Wang YX., Tang Y., Lu Y., Wong IY., Ting DSW., Tan GSW., Jonas JB., Sabanayagam C., Wong TY., Cheng CY. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. // *Ophthalmology*. – 2021. - №128. – P.15-22.

167. Tian M., Dong J., Yuan B., Jia H. Identification of potential circRNAs and circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in the development of diabetic foot ulcers by integrated bioinformatics analysis. // *International Wound Journal*. – 2021. - №18(3). – P.323–331.
168. Tsalamandris S., Antonopoulos AS., Oikonomou E., Papamikroulis GA., Vogiatzi G., Papaioannou S., Deftereos S., Tousoulis D. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. // *Eur Cardiol*. – 2019. - №14. - P.50-59.
169. van Netten JJ., Raspovic A., Lavery LA., Monteiro-Soares M., Rasmussen A., Sacco I.C.N., Bus S.A. Prevention of foot ulcers in the at-risk patient with diabetes: a systematic review. // *Diabetes Metab Res Rev*. – 2020. - №36. - P.50-61.
170. Vasishta S., Umakanth S., Adiga P., Joshi M.B. Extrinsic and intrinsic factors influencing metabolic memory in type 2 diabetes. // *Vascul Pharmacol*. – 2022. - №142. - P10-19. doi:10.1016/j.vph.2021.106933
171. Vecchie A., Montecucco F., Carbone F. et al. Diabetes and vascular disease: is it all about glycemia? // *Current Pharmaceutical Design*. – 2019. – Vol. 25. – № 29. – P. 31-39
172. Veves A., Giurini JM., Guzman RJ., eds. The Diabetic Foot. Medical and Surgical Management. 4-th ed. // HumanaPress. - 2018. - P.515 . doi: 10.1007/978-3-319-89869-8.
173. Veves A., Giurini JM., Guzman RJ. The diabetic foot. Medical and surgical management. // Fourth Edition. Humana Press. - 2018
174. Viswanathan V. Role of molecular genetics in diabetic foot ulcer. // *Polish Archives of Internal Medicine*. – 2017. - №127. – P.310-311. 10.20452/pamw.4036.
175. Viswanathan V., Dhamodharan U., Srinivasan V., Rajaram R., Aravindhan V. Single nucleotide polymorphisms in cytokine/chemokine genes are associated with severe infection, ulcer grade and amputation in diabetic foot ulcer. // *Int J Biol Macromol*. – 2018. - №118. – P.19-25.

176. Volmer-Thole M., Lobmann R. Neuropathy and diabetic foot syndrome. // *Int J Mol Sci.* – 2016. - №17(6). – P.917. doi: 10.3390/ijms17060917
177. Vuorlaakso M., Kiiski J., Salonen T., Karppelin M., Helminen M., Kaartinen I. Major Amputation Profoundly Increases Mortality in Patients With Diabetic Foot Infection. // *Front Surg.* - 2021 - №30,8. –P. 655-663. doi: 10.3389/fsurg.2021.655902.
178. Walton D.M., Minton S.D., Cook A.D. The potential of transdermal nitric oxide treatment for diabetic peripheral neuropathy and diabetic foot ulcers. // *Diabetes Metab. Syndr.* – 2019. - №13. – P.30-38.
179. Wang A., Sun X., Wang W., Jiang K. A study of prognostic factors in Chinese patients with diabetic foot ulcers. // *Diabet. Foot Ankle.* – 2014. - №5. – P.229-236
180. Wang H., Zhu H., Guo Q., Qian T., Zhang P., Li S., Xue C., Gu X. Overlapping Mechanisms of Peripheral Nerve Regeneration and Angiogenesis Following Sciatic Nerve Transection Wang H. // *Front Cell Neurosci.* — 2017. — Vol. 11. — P. 323
181. Wang L, Guo F, Min DH, et al. Analysis of differential gene expressions of inflammatory and repair-related factors in chronic refractory wounds in clinic // *Chinese journal of burns.* – 2019. - №35(1). – P.18-24. doi:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2019.01.005
182. Wang, Y., Tar M.T., Davies K.P. Hyperglycemic memory in the rat bladder detrusor is associated with a persistent hypomethylated state. // *Physiol. Rep.* – 2020. - №8. – P.1–10.
183. Wanzou, J.P.V., Sekimpi, P., Komagum, J.O., Nakwagala F., Mwaka E.S. Charcot arthropathy of the diabetic foot in a sub-Saharan tertiary hospital: A cross-sectional study. // *J. Foot Ankle Res.* – 2019. - №12. – P.33.
184. Weng, L., Zhang F., Wang R. et al. A review on protective role of genistein against oxidative stress in diabetes and related complications // *Chem Biol Interact.* – 2019. – Vol. 310. – P. 23-31.

185. Whittam, A.J., Maan Z.N., Duscher D., Barrera J.A., Hu M.S., Fischer L.H., Khong S., Kwon S.H., Wong V.W., Walmsley, G.G. et al. Small molecule inhibition of dipeptidyl peptidase-4 enhances bone marrow progenitor cell function and angiogenesis in diabetic wounds. // *Transl. Res.* – 2019. - №205. – P.51–63.
186. Woloszyn-Durkiewicz A., Mysliwiec M. The prognostic value of inflammatory and vascular endothelial dysfunction biomarkers in microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes // *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* – 2019. – Vol. 25. – № 1. – P. 28-35
187. World health rankings. <https://www.worldlifeexpectancy.com/ru/uzbekistan-diabetes-mellitus>
188. Wukich DK, Ahn J, Raspovic KM, et al. Comparison of Transtibial Amputations in Diabetic Patients With and Without End-Stage Renal Disease. // *Foot Ankle Int.* -2017. - №38(4). – P.388–396. DOI: 10.1177/1071100716688073
189. Yan C, Chen J, Yang X, Li W, Mao R, Chen Z. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs in Diabetic Foot Ulcers. // *Journal of Diabetes Research.*– 2021. - №14. – P. 25-31. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S310566>
190. Yan J, Tie G, Wang S, Tutto A, DeMarco N, Khair L, et al. Diabetes impairs wound healing by Dnmt1-dependent dysregulation of hematopoietic stem cells differentiation towards macrophages.// *Nat Commun.*- 2018. - №9(1). – P.33.
191. Yang, S.L. Pathophysiology of peripheral arterial disease in diabetes mellitus / S.L. Yang, L.Y. Zhu, R. Han [et al.] // *J Diabetes.* – 2017. – №9 (2). – P.133-140.
192. Zhang P., Lu J., Jing Y., Tang S., Zhu D., Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: A systematic review and meta-analysis. // *Ann. Med.* – 2017. - №49. – P.106–116.

193. Zheng Y., Ley S.H., Hu F.B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2018. - №14. – P.88–98.
194. Zhuang, J., Li, J., Yao, Y., Jing, B., Shan, P., Han, P., & Wang, H. VEGF gene promoter polymorphisms are associated with diabetic foot ulcer. // *Biomedical Research-tokyo.* - 2018.№28, - P.16-23.
195. Zubair M., Jamal A. Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing// *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2019. - № 8. – P. 1–11.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВКМ** – внеклеточный матрикс
- ВОЗ** – Всемирная организация здравоохранения
- ДН** – диабетическая нейропатия
- КИНК** – критическая ишемия нижних конечностей
- МЦР** – микроциркуляторное русло
- ОБА** – общая бедренная артерия
- ПБА** – поверхностная бедренная артерия
- ПББА** – передняя большеберцовая артерия
- ПкА** – подколенная артерия
- ПХ** – перемежающаяся хромота
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- СД** – сахарный диабет
- СДС** – синдром диабетической стопы
- ТсРО₂** – транскутанное напряжение кислорода
- УЗДС** - ультразвуковое дуплексное сканирование
- ФР** – фактор роста
- IL 6** – интерлейкин 6
- TNF- α** – фактор некроза опухоли – α
- VEGF** – фактор роста эндотелия сосудов