



GENETICKÉ ASPEKTY DIABETICKEJ RETINOPATIE

PETRA PRIŠČÁKOVÁ

VANDA REPISKÁ



GENETICKÉ ASPEKTY DIABETICKEJ RETINOPATIE

AUTORI

Mgr. Petra Priščáková

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej
genetiky, Lekárska fakulta Univerzity
Komenského, Sasinkova 4, Bratislava

Prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej
genetiky, Lekárska fakulta Univerzity
Komenského, Sasinkova 4, Bratislava

RECENZENTI

Prof. MUDr. Viktor Matejčík, PhD.

doc. Ing. Ingrid Žitňanová, PhD.

Ing. Helena Gbelcová, Ph.D.

SPRACOVALA A VYDALA

spoločnosť

© **MEDIREX GROUP ACADEMY**, n. o.,
Bratislava 2016

TEXT

© **Mgr. Petra Priščáková**

© **Prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.**

GRAFICKÉ SPRACOVANIE

morrow creative, s.r.o.

OBSAH

Zoznam skratiek	6
Predhovor	12
1. Úvod	14
2. <i>Diabetes mellitus</i>	16
3. Diabetická retinopatia	18
4. Genetické aspekty diabetickej retinopatie	27
4.1. Štúdium kandidátnych génov	29
4.1.1. Polyolová dráha	30
4.1.2. Receptor pre koncové produkty pokročilej glykácie	32
4.1.3. Rastové faktory	34
4.1.4. Deregulácia renín-angiotenzín-aldosterónového systému	37
4.1.5. Iné polymorfizmy kandidátnych génov ovplyvňujúce riziko vzniku diabetickej retinopatie	39
4.2. Väzbové štúdie	51
4.3. Genetické asociačné štúdie	53
5. Epigenetické mechanizmy zapojené do diabetickej retinopatie	55
6. Iné prístupy štúdia diabetickej retinopatie (biomarkery, proteomika, metabolomika)	61
7. Terapeutické prístupy a perspektívy	64
7.1. Dyslipidémia	69
7.2. Neurodegenerácia	71
7.3. Nanomedicína	75
8. Záver	77
9. English summary	79
10. Literatúra	83
11. Zoznam tabuliek	115

ZOZNAM SKRATIEK

8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanozín
A	adenín
ACE	angiotenzín konvertujúci enzým
ACEI	inhibítor ACE
acetyl-CoA	acetylkoenzým A
ADMA	asymetrický dimetylarginín
AGEs	koncové produkty pokročilej glykácie
AGT	angiotenzinogén
AKR1B1/ALR2	aldózoreduktáza
AKT3	RAC-gama serín/treonín-proteínkináza
ALDH2	mitochondriálna aldehyddehydrogenáza 2
ALE	koncový produkt pokročilej lipoxidácie
ALR2	aldózoreduktáza 2
AMD	makulárna degenerácia súvisiaca s vekom
AMPA	kyselina α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolepropiónová
ANG-1, ANGPT1	angiopoetín 1
ANGTR	angiotenzínový receptor
AP-1	aktivátorový proteín 1
APOE	apolipoproteín E
ARB	blokátor receptora pre AT
AS	angiotatín
AT I, II	angiotenzín I, II
ATF4	aktivačný transkripčný faktor 4
BBS2	Bardet-Biedl syndróm 2 proteín
bFGF/FGF2	fibroblastový rastový faktor 2
BMI	index telesnej hmotnosti
c.	kódujúca sekvencia nukleotidov
C	cytozín
C3	komponent 3
C5	komponent 5
CaD	kalcium dobezilát

CARe	<i>Candidate gene Association Resource</i>
CAT	kataláza
CFB	komplementový faktor B
CFH	komplementový faktor H
CHN2-CPVL	chimerín 2 - karboxypeptidáza
circRNA	cirkulujúce RNA
CML	N-karboxymetyl-lyzín
Cox-2	cyklooxygenáza 2
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
CBP	CREB väzobný proteín
CREB	väzobný proteín cAMP responzívneho elementu
CTGF	rastový faktor spojivových tkanív
CTSH	kathepsín H
CXCL1	chemokínový ligand 1 s C-X-C motívom
DAG	diacylglycerol
dbSNP	databáza jednonukleotidových polymorfizmov (<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>)
DCCT	<i>The Diabetes Control and Complications Trial</i>
DIRECT	<i>Diabetic Retinopathy Candesartan Trial</i>
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DM1	<i>diabetes mellitus typ 1</i>
DM2	<i>diabetes mellitus typ 2</i>
DME	diabetický makulárny edém
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA-metyltransferáza
DR	diabetická retinopatia
DRD	dopamínový receptor
EB	endotelová bunka
EBM	endotelová bazálna membrána
ECM	extracelulárny matrix
EDN1	endotelín-1
eNOS3	endotelová syntáza oxidu dusnatého
EDIC	<i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
ENPP1	ektonukleotidová pyrofosfatáza/fosfodiesteráza 1

EPO	erytropoetín	LDL	nízkoenzitný lipoproteín
ER	endoplazmatické retikulum	lincRNA	dlhé nekódujúce intergénové RNA
ERBB3/ HER3	receptor 3 pre ľudský epidermálny rastový faktor	Lp(a)	lipoproteín (a)
ES	endostatin	lncRNA	dlhé nekódujúce RNA
ET-1	endotelín	LOD skóre	<i>logarithm (base10) of odds</i>
FLT1/ VEGFR1	FMS-podobná tyrozín kináza 1/receptor pre VEGF	LSD-1	lyzín špecifická histón demetyláza 1
fms/ CSF1R	receptor pre stimulujúci faktor kolónií 1	MAC	komplex atakujúci membrány
FRMD3	proteín 3 obsahujúci FERM doménu	MCP-1	monocytový chemotaktický proteín 1
G	guanín	mfERG	multifokálny elektroretinograf
GLO1	glyoxyláza I	miRNA	microRNA
GLUT1/ SLC2A1	glukózový transportér 1 (<i>solute carrier family 2, member 1</i>)	MMP-2	matrixová metaloproteináza 2
GSH	glutatión	MODY	<i>maturity onset diabetes of the young</i>
GSTT1, GSTM1	glutatión S-transferáza T1, M1	mRNA	mediátorová RNA
GWAS	celogenómová asociačná štúdia	mtDNA	mitochondriálna DNA
HAT	histónacetyltransferáza	MTHFR	metyléntetrahydrofolát reduktáza
HbA1C	glykovaný hemoglobín	NAD+	nikotínamidadenín dinukleotid
HDAC	histón deacetyláza	NAPD+	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
HDL	vysokoenzitný lipoproteín	ncRNA	nekódujúce RNA
HGF	hepatocytový rastový faktor	NF-κB	nukleárny faktor kapa B
HIF-1α	hypoxiou indukovaný faktor 1 alfa	NGS	sekvenovanie novej generácie
HLA-B	hlavný histokompatibilný komplex, trieda I, B	NK	nukleová kyselina
HO-1	hémoxigenáza-1	NLC	nanoštruktúrny lipidový nosič
HRB	hemato-retinálna bariéra	NMDA	N-metyl-D-asparagová kyselina
HTR1B	serotonínový receptor 1B	NO	oxid dusnatý
HTRA1/ARMS2	HtrA serínová peptidáza 1 (<i>Age-Related Maculopathy Susceptibility 2</i>)	NOX4	NADPH oxidáza 4
ICAM-1	intercelulárna adhezívna molekula	NPDR	neproliferatívna DR
IGF-1	rastový faktor podobný inzulínu 1	NPY	neuropeptid Y
IL-10	interleukín-10	NPY2R	receptor 2 pre neuropeptid Y
INS/DEL	inzercia/delécia	Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
INSR	inzulínový receptor	O2-	superoxidový kyslíkový radikál
IO	intraokulárny	OLR1	receptor 1 pre oxidovaný LDL (podobný lektínovému typu)
ITG	integrín	ONOO-	peroxynitrit
KO	knokautovanie	OPG/OCIF	osteoprotegerín/inhibičný faktor osteoklastogenézy
		p.	sekvencia aminokyselín



p300/CBP	CREB viažúci proteín
p65	transkripčný faktor, podjednotka NK-κB
PAI-1	inhibitor aktivátora plazminogénu 1
pCAF	faktor asociovaný s p300/CBP
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PDGF	rastový faktor odvodený z trombocytov
PDR	proliferatívna diabetická retinopatia
PEDF	faktor odvodený z pigmentového epitelu
piRNA	Piwi-interagujúce RNA
PKC	protein kináza C
PLA2G4A	fosfolipáza A2, skupina IVA
PLXDC2	proteín 2 obsahujúci plexínovú doménu
POLG1	podjednotka gama DNA polymerázy
PON1, 2	paraoxonáza 1, 2
PPARγ	peroxizómovým proliferátorom aktivovaný receptor gama
PROS1	proteín S
PSMD9	proteazómová podjednotka 26S
RAAS	renín–angiotenzín–aldosterón systém
RAGE	receptor pre koncové produkty pokročilej glykácie
RCS	reaktívna forma uhlíka
RNA	ribonukleová kyselina
ROBO2	<i>roundabout, axon guidance receptor, homológ 2</i>
ROCK2	Rho-asociovaná proteín kináza 2
Romo-1	modulátor reaktívnych foriem kyslíka 1
ROS	reaktívne formy kyslíka
RPE	retinálny pigmentový epitel
RXRA	retinoidný X receptor alfa
RXRG	retinoidný X receptor gama
SAM	S-adenozyl metionín
SDF-1	faktor 1 odvodený zo stromálnych buniek
SDH	sorbitoldehydrogenáza
SELP	P-selektín
siRNA	krátke interferujúce RNA
SLC24A3	<i>solute carrier family 24, member 3</i>

SLN	tuhá lipidová nanočastica
SMRT	jednomolekulové real-time sekvenovanie
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus
SOD 2/MnSOD	superoxiddismutáza II/ mitochondriová superoxiddismutáza závislá na mangáne (MnSOD)
Sp1	špecifický proteín 1
SST	somatostatíny
STAT3	transduktor signálu a aktivátor transkripcie 3
T	tymín
TCF4/TCF7L2	transkripčný faktor 4 (<i>transcription factor 7-like 2</i>)
TF	transferín
TGF-β1	transformujúci rastový faktor beta 1
TLR4	toll-like receptor 4
TNF-α	tumor nekrotizujúci faktor alfa, faktor nádorovej nekrózy alfa
TNF-β/ LTA	tumor nekrotizujúci faktor beta (lymfotoxín-alfa)
TSG	tumor supresorový gén
TXNIP	tioredoxín-interagujúci proteín
UCP 1, 2	<i>uncoupling protein 1, 2</i>
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
USFDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
VDR	receptor pre vitamín D
VEGF	vaskulárny endotelový rastový factor
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (<i>World Health Organization</i>)

PREDHOVOR

Predkladaná vedecká monografia je určená pre lekárov v špecializačnej príprave, diabetológov, oftalmológov, ale aj iných odborníkov zaoberajúcich sa problematikou diabetickej retinopatie. Obsahuje najnovšie a komplexné poznatky z oblasti genetiky o diabetickej retinopatii.

Autormi sú molekulárni biológovia a genetici, ktorých snahou bolo poukázať na obrovskú heterogenitu analyzovaných génov v problematike mechanizmu vzniku a progresie diabetickej retinopatie.

Diabetická retinopatia (DR) je pomerne častá a závažná komplikácia diabetu, ktorá bez terapeutického zásahu môže viesť priamo k strate zraku. Napriek množstvu odborníkov, ktorí sa tejto tematike venujú, jej genetické aspekty nie sú doposiaľ dostatočne prebádané a objasnené. Vedci v súčasnosti prekonávajú hranice medzi výskumom a klinickou praxou. Využívajú animálne modely a malé klinické štúdie. Snahou je identifikovať kandidátne gény zapojené do patofyziológie tejto choroby a vytvoriť priestor pre multidisciplinárnu diskusiu na integrovanejší prístup, založený na spolupráci s lekármi a inými odborníkmi. Očakáva sa, že odborníci z klinickej praxe budú schopní prispieť svojimi poznatkami a spolupracovať s genetikmi, čoho výsledkom by bola optimalizácia prevencie a postupov liečby, zvýšenie jej efektivity a zlepšenie benefitu pacientov. Identifikovanie najrôznejších biomarkerov by napomohlo pri vývoji presnejšej diagnostiky a novej personalizovanej terapie, ako aj pri určovaní prognózy diabetickej retinopatie. Obsahom monografie je zhrnutie vedeckých poznatkov získaných z genetických analýz diabetickej retinopatie. Našou snahou je inšpirovať k spolupráci predovšetkým klinických pracovníkov, s cieľom odhaliť aspekty diabetickej retinopatie. Táto monografia by mala slúžiť na pomoc pri získaní základných poznatkov ohľadom toho, ktoré gény a ich polymorfizmy boli skúmané v tejto oblasti a napomôť v nasmerovaní ďalších genetických výskumov diabetickej retinopatie. Očakávaná spolupráca by mala byť zameraná na výmenu najnovších poznatkov v oblasti medicíny, vedy a výskumu DR, implementácie nových liečebných postupov, manažmentu pacientov, a na spoluprácu s patientskými organizáciami a inštitúciami pre ďalšie vzdelávanie odbornej verejnosti. Nezanedbateľným prínosom je aj to, že etablované metodické postupy získané analýzou génov v patogenéze diabetickej retinopatie sa budú dať využiť pri iných chronických civilizačných ochoreniach s multifaktoriálnou etiológiou.

V práci je uvedený relatívne vysoký počet génov a genetických pojmov. Pre ich

prehľadnosť sú v závere monografie umiestnené tabuľky všetkých známych DNA polymorfizmov a ich funkcií v patogenéze DR. Genetické pojmy sú ozrejmené priamo v texte.

Táto monografia vznikla za podpory grantu Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií, ITMS 26240120038, Operačný program výskum a vývoj 2013/4.1/04-SORO.

1. ÚVOD

S nárastom počtu pacientov s civilizačnými ochoreniami, ku ktorým patrí aj *diabetes mellitus* (DM), sa spájajú mnohé výzvy. Ide o hľadanie adekvátnych zdravotníckych, sociálnych aj celospoločenských postupov pre minimalizáciu výskytu komplikácií týchto ochorení a predĺženie strednej doby prežívania ako kľúčového parametra pri hodnotení zdravotného stavu obyvateľstva príslušnej krajiny. *Diabetes mellitus* je jedným z najčastejších medicínsky závažných chronických ochorení, ktoré je spôsobené deficitom alebo nedostatočným účinkom hormónu inzulínu, čo vedie k trvalej hyperglykémii. Významne skracuje dĺžku života, zhoršuje jeho kvalitu a vplýva na sociálno-ekonomické postavenie pacienta. Čoraz viac zamestnáva myseľ vedcov, lekárov, ale aj laickej verejnosti. Príčinou je neustály nárast počtu pacientov s diabetom, ako aj riziko vzniku ťažkých komplikácií, ktoré môžu viesť k poškodeniu obličiek, zraku, nervov, a v neposlednom rade i k vzniku srdcových a mozgovo-cievnych príhod. DM nielenže znižuje kvalitu života človeka, ale môže viesť dokonca aj k predčasnému úmrtiu. Štatistiky Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) uvádzajú alarmujúci vzostup výskytu diabetu na celom svete. Pri súčasnej 7,3 % prevalencii sa predpokladá, že do roku 2030 bude vo svete až 366 miliónov diabetikov.

Diabetická retinopatia je degeneratívne ochorenie sietnice a postihuje pacientov s cukrovkou. Spolu s diabetickým makulárnym edémom patrí k častým a závažným komplikáciám diabetu a je najčastejšou príčinou slepoty u pacientov v produktívnom veku v civilizovaných krajinách. Pri zle korigovanej hladine cukru v krvi (glykémii) dochádza k nezvratným štrukturálnym a funkčným zmenám na úrovni cievneho a nervového tkaniva sietnice. Hyperglykémia, zápal a oxidačný stres sú hlavné faktory v patogenéze DR. Z tohto dôvodu je veľmi dôležitý skrining, monitoring, ako aj včasná intervencia zameraná na minimalizáciu vzniku slepoty predovšetkým u vysoko rizikovej skupiny pacientov. Napriek množstvu poznatkov nie je úplne jasný mechanizmus rozvoja tohto ochorenia a existuje stále veľa otáznikov. Na vývin DR má vplyv spolupôsobenie širokej škály génov, ale dá sa očakávať, že vplyv samostatných génov jednotlivo bude pomerne zanedbateľný. Z tohto dôvodu sú výsledky DNA analýz jednotlivých separátnych génov málo významné a v niektorých prípadoch aj protichodné. Zdôrazňuje sa potreba optimalizácie diagnostických metód, ktoré umožnia včasnú a presnú identifikáciu diabetických pacientov so zvýšeným rizikom rozvoja DR. Ideálne by bolo identifikovať marker, prípadne viac markerov súvisiacich so zvýšeným rizikom rozvoja DR ešte pred rozvinutím subklinických štrukturálnych zmien na sietnici. Výsledkom by bola optimálna prevencia, ktorá by zmiernovala doživotné zdravotné následky diabetických komplikácií. Pretrváva snaha priniesť poznatky, ktoré budú aplikovateľné

do každodennej praxe v starostlivosti o pacientov, a to v oblasti prevencie, diagnostiky alebo liečby. Úspech tejto stratégie je založený na získaní, spracovaní a vyhodnotení nových poznatkov vo výskume a vývoji.

2. DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM, cukrovka) je jedným z celosvetovo najrozšírenejších závažných civilizačných ochorení. Počet pacientov s diabetom každoročne rapídne vzrastá. Diabetes v roku 2015 zapríčinil približne 5 miliónov úmrtí v rámci celosvetovej dospeléj populácie (IDF, 2015). V roku 2014 malo stanovenú diagnózu diabetu 422 miliónov ľudí (*Global report on diabetes. World Health Organization, Geneva, 2016*) a 318 miliónov trpelo poruchou glukózovej tolerancie, ktorou sa pacienti zaraďujú do kategórie vysokého rizika vzniku a rozvoja diabetu v budúcnosti. Predpokladá sa, že v roku 2040 bude vo svete až 642 miliónov pacientov s diabetom (IDF, 2015). Neustále zvyšovanie množstva pacientov s touto diagnózou je pripisované viacerým príčinám, a to najmä starnutiu celosvetovej populácie, rastúcej miere obezity a zníženej fyzickej aktivite.

Diabetes mellitus je porucha metabolizmu, ktorá sa prejavuje zvýšenou hladinou glukózy v krvi. K poruche metabolizmu sacharidov dochádza v dôsledku neschopnosti organizmu produkovať dostatočné množstvo hormónu inzulínu (diabetes typu 1, DM1, inzulín-dependentný alebo od inzulínu závislý diabetes) alebo v dôsledku vytvorenia bunkovej inzulínovej rezistencie (diabetes typu 2, DM2, noninzulín-dependentný alebo od inzulínu nezávislý diabetes). DM1 je spôsobený deštrukciou β - buniek Langerhansových ostrovčiek pankreasu. Deštrukcia je často imunologicky indukovaná a vedie k úplnej strate schopnosti buniek produkovať inzulín, a teda k úplnej inzulínovej deficícii. DM1 tvorí približne 5-10 % z celkového výskytu diabetu a objavuje sa často v mladom veku. Na vzniku DM2 sa podieľajú genetické, ako aj negenetické faktory. DM2 je charakterizovaný inzulínovou rezistenciou tkanív pri relatívnom až absolútnom nedostatku inzulínu. K negenetickým faktorom patrí vyšší vek, nadmerný príjem kalórií v strave, nadváha (BMI nad 27), centrálny typ obezity (typ „jablko“), sedavý spôsob života a nízka pôrodná hmotnosť. DM2 je diagnostikovaný v 90-95 % prípadoch (LeRoith a kol., 2004).

Pokroky v medicíne, včasná a presnejšia diagnostika, personalizovaná inzulínová liečba a zvýšená starostlivosť o diabetikov umožňujú síce zlepšiť prežívanie pacientov, no zároveň dochádza k zvýšenému výskytu chronických komplikácií diabetu, ktoré pacientom výrazne zhoršujú kvalitu života a celkový zdravotný stav. Cieвне postihnutia asociované s diabetom (**diabetické angiopatie**) patria k najzávažnejším a častým komplikáciám diabetu. Na následky zomiera 75 % diabetikov. Na základe patofyziologických a klinických odlišností sa diabetické angiopatie rozdeľujú na **mikroangiopatie**, ktoré postihujú malé a drobné cievy (retinopatia, nefropatia a neu-

ropatia) a **makroangiopatie** postihujúce veľké a stredne veľké cievy (ischemická choroba srdca, ateroskleróza, hypertenzia a cerebrovaskulárna choroba) (Hulín a kol., 2002; Petrovič, 2013).

Diabetickú mikroangiopatiu je možné opísať ako generalizované ochorenie drobných ciev (diameter $<100\ \mu\text{m}$), ktoré následne vedie k poruchám mikrocirkulácie. Najčastejšie sú postihnuté cievy sietnice oka (**diabetická retinopatia**) a glomeruly v obličkách (**diabetická nefropatia**).

Diabetická makroangiopatia postihuje stredné a veľké cievy, cievy srdca (ischemická choroba srdca), mozgu (cerebrovaskulárna choroba) a končatín (periférna angiopatia dolných končatín) (Mohan a kol., 2011). Dochádza k rýchlemu rozvoju aterosklerózy, čo je proces ukladania tukových látok do steny ciev, k zápalu a ich následnej prestavbe. Ateroskleróza vedie k zúženiu prievitu ciev, a tým k obmedzeniu prietoku krvi. V cievach dochádza ku kalcifikácii a vzniku trombóz aterosklerotických plátov. Spúšťačmi angiopatií sú vysoká hladina lipidov v krvi - **hyperlipidémia** a vysoký krvný tlak - hypertenzia (Hulín a kol., 2002). Hypertenzia sa u diabetikov vyskytuje 1,5-2 krát častejšie než u bežnej populácie. Riziko rozvoja cievnych komplikácií exponenciálne narastá so závažnosťou artériovej hypertenzie (Lopes de Faria a kol., 2011).

Diabetická neuropatia je ďalšou nemenej závažnou komplikáciou diabetu. Dlhodobou zvýšená hladina cukru v krvi a koncové produkty pokročilej glykácie pôsobia toxicky na nervové tkanivo. Periférna neuropatia sa najčastejšie klinicky prejavuje na dolných končatinách a často sa vyvinie do obrazu tzv. „diabetickej nohy“. Autonómna neuropatia sa prejavuje poruchou fungovania orgánových sústav (trávenie, vylučovanie, funkcia srdcovo-cievneho systému).

Dobrá kompenzácia diabetu je kľúčová pri predchádzaní vzniku vyššie spomenutých komplikácií. Pravidelné monitorovanie hladiny glykovaného hemoglobínu (HbA1c) v krvi odráža priemerné hodnoty glykémie počas 3 mesiacov (čo zodpovedá životnému cyklu erytrocytu). Za dobre kompenzovaný diabetes sa považujú hodnoty HbA1c pod 7 %, ktoré predurčujú nižšiu incidenciu vzniku diabetických komplikácií v budúcnosti (u zdravej populácie je to do 5 %) (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993).

3. DIABETICKÁ RETINOPATIA

Diabetická retinopatia (DR) patrí k degeneratívnym ochoreniam sietnice. Je jednou z mikrovaskulárnych komplikácií diabetu a je najčastejšou príčinou slepoty u ľudí v produktívnom veku v priemyselne vyspelých krajinách sveta. Trpí ňou 22-37 % diabetických pacientov, z toho u 2 % diabetikov spôsobuje úplnú slepotu (Mohan a kol., 2011). Za hlavné rizikové faktory vzniku a rozvoja DR sa považujú dĺžka trvania diabetu, dlhodobé zle kontrolovaná glykémia, fajčenie, konzumácia alkoholu, vysoký krvný tlak, hyperlipidémia, hormonálna antikoncepcia, mikroalbuminémia, obezita a anémia. Riziko mikrovaskulárnych komplikácií vzrastá so stúpajúcou hladinou glykovaného hemoglobínu.

Metódy diagnostiky diabetickej retinopatie v klinickej praxi sú oftalmoskopia (vyšetrenie očného pozadia), optická koherentná tomografia, fotografovanie sietnice a fluorescenčná angiografia, ktoré sa spoločne zameriavajú na identifikáciu štrukturálnych zmien na sietnici (Sivaprasad a kol., 2012). **Natrium-fluoresceínová angiografia** je presná a citlivá metóda zobrazujúca cievy sietnice a ich poškodenie. Odhaľuje rozsah ischemických miest, presakovania ciev a mikroaneurizmy. **Optická koherentná tomografia** zobrazuje jednotlivé vrstvy sietnice ako rezy tkanivom a má mimoriadny význam pri vyhodnocovaní progresie edému makuly, prípadne ústupu nálezu následkom úspešnej liečby. **Oftalmoskopickým vyšetrením** sa sleduje každých 6 až 12 mesiacov očné pozadie diabetických pacientov a používa sa skôr ako hrubý skrining na zistenie zmien na sietnici.

Včasný záchyt retinopatie a prevencia progresie do terminálnych štádií závisí od pravidelných kontrol očného pozadia, od dobrej spolupráce a informovanosti pacienta, a od skorej lokálnej liečby s cieľom, čo najdlhší čas zachovať, čo najvyššiu kvalitu zraku.

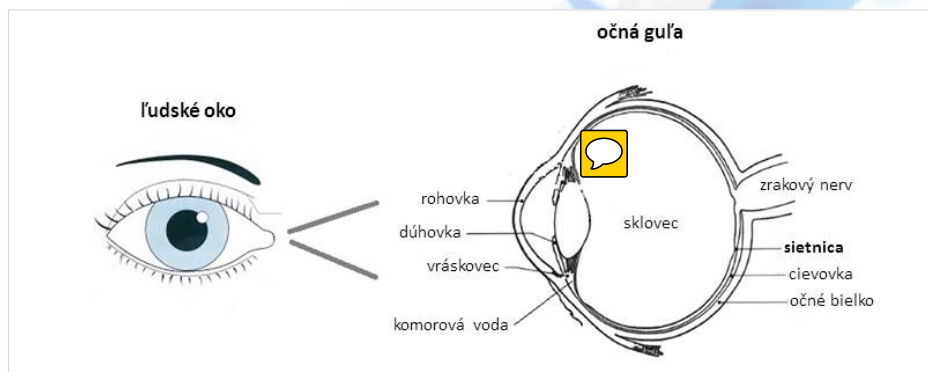
U pacientov s **diabetom typu 1** sa v období do 5 rokov od diagnostikovania cukrovky retinopatia nevyskytuje. Po 15 rokoch trvania diabetu prevalencia retinopatie narastá na 75-95 % a po 30 rokoch sa blíži až k 100 %. Proliferatívna DR (PDR) je pri 15-ročnom trvaní tohto typu diabetu zriedkavá, ale po 20 rokoch je prítomná až u 50 % pacientov. **Pri diabete typu 2** je často ťažké určiť nástup ochorenia, a teda aj trvanie DM. Incidencia DR vzrastá s dĺžkou trvania cukrovky. Asi u 3-4 % pacientov býva prítomná DR už v čase záchytu diabetu. Na rozdiel od diabetu typu 1, výskyt proliferatívneho štádia býva po 20 rokoch trvania cukrovky

len u 5-10 % pacientov, zatiaľ čo neproliferatívne štádium sa objavuje u 60 % po 14-16 rokoch trvania ochorenia (Lee a kol., 2015). Takmer u všetkých pacientov s DM1 a u viac ako 60 % pacientov s DM2 je očakávaný rozvoj diabetickej retinopatie počas prvých desiatich rokov od diagnostikovania diabetu.

Sietnica (retina) je tenká transparentná štruktúra lokalizovaná v zadnej časti oka a obsahuje svetlocitlivé štruktúry. Pozostáva z viacerých vrstiev. Je bohatá na nenasytené mastné kyseliny, má veľkú metabolickú aktivitu s významnou spotrebou kyslíka a vysokou mierou oxidácie glukózy. Schematické znázornenie štruktúry oka je na obrázku 1. Bunky sietnice sú rozdelené do 3 základných skupín:

- neurálna zložka (fotoreceptory, interneuróny a gangliové bunky) – konverzia svetla na elektrické signály
- gliová zložka (Müllerove bunky, astrocyty a mikroglia) – podporné bunky s metabolickou a modulačnou funkciou
- vaskulárna zložka (cievy sietnice a pericyty - murálne bunky) (Fangueiro a kol., 2015)

Neliečený *diabetes mellitus* má za následok poškodenie neurálnej aj cievnej zložky sietnice. Patologické procesy prebiehajúce v rámci DR vedú k degenerácii tkaniva sietnice spôsobenej poruchou mikrocirkulácie. Príčinou je chronická hyperglykémia pri úplnom alebo relatívnom nedostatku inzulínu a následné dlhodobé vystavenie organizmu zmenám metabolických procesov vyvolaných diabetom. Dochádza k štrukturálnemu a funkčnému poškodeniu kapilár sietnice a k poruche ich autoregulácie. V prípade, že diabetes nie je dostatočne liečený, môže dôjsť k trvalému oslepnutiu.



Obr. 1 Schematické znázornenie hlavných fyziologických štruktúr oka

(upravené a preložené podľa Fanguero a kol., 2015)

DR sa rozdeľuje podľa štrukturálnych zmien sietnice na dva typy, a to na klinicky menej závažnú **neproliferatívnu diabetickú retinopatiu (NPDR)** a závažnú **proliferatívnu diabetickú retinopatiu (PDR)**. Na základe klinických prejavov, teda prítomnosti/nepřítomnosti jednotlivých príznakov, môžu byť neproliferatívna aj proliferatívna DR klasifikované do viacerých štádií.

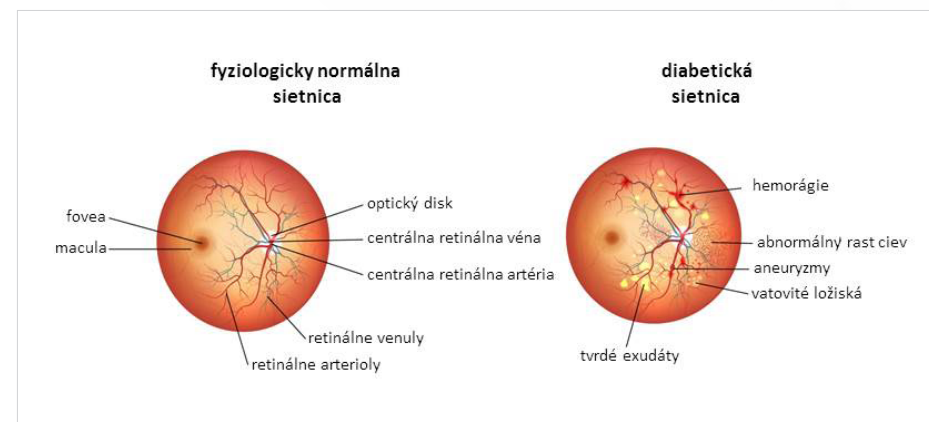
Neproliferatívna diabetická retinopatia:

- mierna: v sietnici sú prítomné ojedinelé mikroaneuryzmy, sporadické bodové zakrvácania
- stredne závažná: viaceré mikroaneuryzmy v sietnici, ojedinelé intraretinálne hemorágie, exsudáty z presakovania ciev
- ťažká forma: veľký počet mikroaneuryziem (minimálne v 4 kvadrantoch sietnice) v sietnici, objavujú sa mikroinfarkty patologicky zmenených kapilár pripomínajúce biele vatovité ložiská (cotton wool spots), tvrdé exsudáty

Proliferatívna diabetická retinopatia:

- začínajúca: zmeny ako u ťažkej formy NPDR, ojedinelá neovaskularizácia, exsudáty, pokračujúce preretinálne hemorágie
- s vysokým rizikom: neovaskularizácia pokračuje, objavuje sa aj intravitreálna hemorágia, ružencovité dilatované vény (úseky ciev s dilatáciami a zúženiami)
- pokročilá s komplikáciami: masívne hemorágie (v sietnici aj sklovci), tvorba fibrovas-

kulárných pruhov membrán, odlupovanie sietnice, rubeóza (začervenanie) dúhovky na základe novotvorby ciev, prípadne až neovaskulárny glaukóm (Kiřová a kol., 2013) (obr. 2).



Obr. 2 Fyziologicky normálna a diabetická sietnica

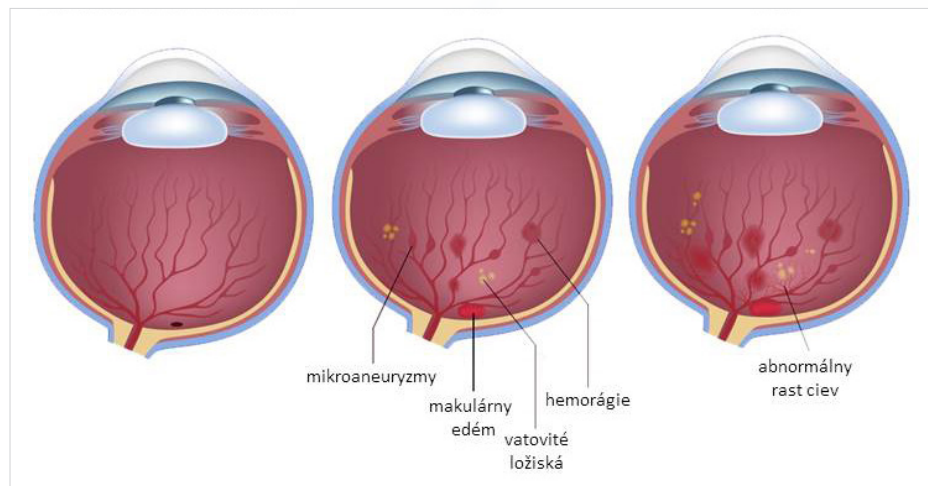
(upravené a preložené podľa Iné zdroje - odkaz 1)

V pokročilých fázach NPDR dochádza k vážnemu poškodeniu endotelu ciev, strate pericytov, a tým k poruche autoregulácie kapilár sietnice. Časom sú kapiláry tvorené len zhrubnutými bazálnymi membránami, ktoré sú náchylné k trombóze (Simó, Hernández, 2015).

Diabetický makulárny edém (DME), teda opuch žltej škvrny (makuly), sa môže rozvinúť v ktorejkoľvek fáze ochorenia. Práve DME je často príčinou porúch zraku diabetických pacientov. Makula je miesto s najvyššou koncentráciou svetlocitlivých buniek na sietnici, t.j. miesto najostrejšieho videnia. DME sa klinicky prejavuje poklesom centrálnej zrakovkej ostrosti (výpadok centrálnej časti zorného poľa). Môže sa rozvinúť v ktoromkoľvek štádiu ochorenia. Vyskytuje sa dvakrát častejšie pri DM2 než pri DM1 (Burditt a kol., 1968). **Diabetická iridopatia** označuje stav, kedy sa pri tvorbe fibrovaskulárneho väziva v prednej očnej komore tvoria synéchie (pozápalové zrasty), ktoré zhoršujú zrak. V prípade, že dochádza k tvorbe ložísk v kapsule šošovky, jedná sa o **diabetickú kataraktu**, šedý zákal (Kiřová a kol., 2013).

Rozdiel medzi NPDR a PDR v rámci prejavov na sietnici vrátane DME je znázornený na obr. 3.

K poruchám zraku vedú len neskoré štádiá retinopatie, ale tieto zmeny sa odvíjajú od patofyziologických procesov prebiehajúcich v prvotných štádiách ochorenia (Calcutt a kol., 2009).

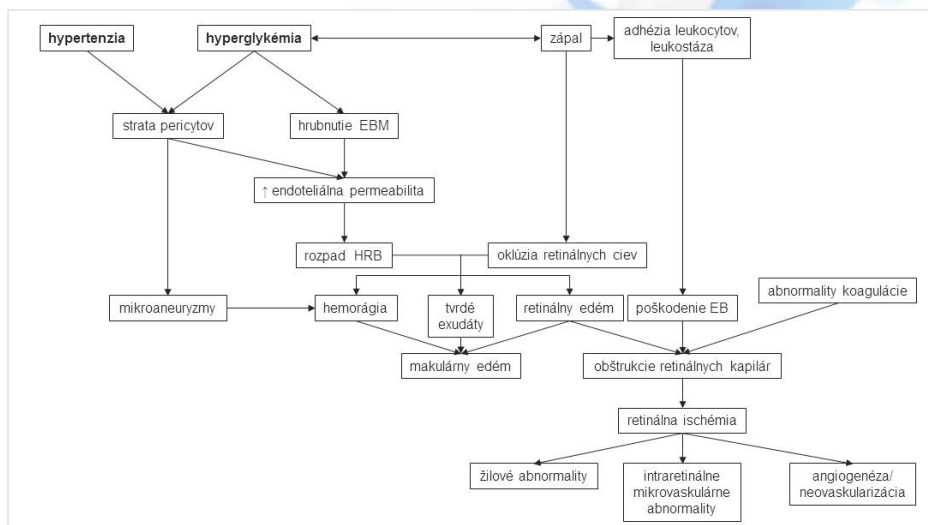


Obr. 3 Sietnica v štádiu NPDR a PDR. DR – diabetická retinopatia, NPDR – neproliferatívna DR, PDR – proliferatívna DR
(upravené a preložené podľa Iné zdroje - odkaz 2).

Hyperglykémia, zvýšená tvorba **kyslíkových radikálov** a chronický subklinický **zápal** sú významnými induktormi spúšťajúcimi patofyziologické procesy v rámci DR. Štrukturálne zmeny v sietnici sprevádzajúce diabetickú retinopatiu začínajú hrubnutím kapilárnej bazálnej membrány a následne dochádza k **strate pericytov** (mezotelových buniek), ktoré obklopujú endotelové bunky kapilár sietnice. Endotelové bunky tvoria jednobunkovú vrstvu a oddelujú všetky tkanivá od cirkulujúcej krvi (Favero a kol., 2014). Zvýšené množstvo zápalových mediátorov vedie k aktivácii leukocytov, k ich adhézii k endotelu ciev (**leukostáza**) a zmenám hemato-retinálnej bariéry (HRB) (Simó, Hernández, 2015). Vonkajšiu časť bariéry tvoria bunky pigmentového epitelu sietnice a vnútornú vrstvu tvoria endotelové bunky ciev. Dochádza k narušeniu ich tesných medzibunkových spojov (*tight junctions*), a tým k rozpadu HRB, čo spôsobuje kapilárne presako-

vanie (Simó a kol., 2014). Hrubnutie bazálnej membrány je spojené aj so zmenami chemického zloženia membrány (glykované proteíny, viac kolagénu IV, menej kyseliny sialovej a heparansulfátu), čo prispieva k zvýšenej permeabilite kapilár (Hulín a kol., 2002). Zmenou pomeru pericytov k endotelovým bunkám sa mení cytoskelet a naruša sa kontraktilita kapilár (Klener a kol., 2011). Vplyvom deštrukcie pericytov v sietnici a následnou fenestráciou kapilár dochádza k nadmernému presakovaniu (Petrovič, 2013). Na presakovanie kapilár môže mať vplyv aj abnormálna produkcia proteínov extracelulárnej matrix: kolagén IV, fibronektín a laminín (Oshitari a kol., 2006). Poškodenie endotelu nastáva aj priamym toxickým pôsobením glukózy, ktoré naruša spojenia endotelových buniek, prípadne aj vplyvom jej metabolitov (sorbitol). Dochádza k poruche funkcie endotelu. **Endotelová dysfunkcia** je popisovaná ako nerovnováha v produkcii a aktivite vazodilatačných (NO, prostacyklín) a vazokonstrikčných látok (endotelín, tromboxán, angiotenzín) (Dal, Sigrist, 2016). Kapiláry sa v miestach chýbania pericytov dilatujú. Bunky ciev proliferujú a vznikajú drobné výdute ciev - **mikroaneuryzmy** (Kiřová a kol., 2013). Mikroaneuryzmy a zvýšená permeabilita kapilár vedú k tvorbe exsudátov – zápalových výpotkov (Hulín a kol., 2002).

Z hľadiska funkčných zmien sa zvyšuje adhezivita erytrocytov a agregáčna schopnosť trombocytov (Hulín a kol., 2002). Upchaté, trombotické kapiláry spôsobujú **mikroinfarkty na sietnici**, viditeľné ako biele vatovité ložiská (*cotton-wool spots*) a zároveň vplyvom priepustnosti kapilár uniká **exsudát** z plazmy. Mikroaneuryzmy majú tendenciu k praskaniu a krvácaniu, zároveň dochádza k uzatváraniu kapilár s následnou ischemiou tkaniva sietnice (Simó, Hernández, 2015). Na miestach opakovane nedokrvnených (ischemizovaných) dochádza k ukladaniu tukových látok a tvorbe **tvrdých exsudátov**. Hypoxia (nedostatok kyslíka) v sietnici následne vedie k zvýšenej produkcii angiogénnych rastových faktorov a tým k novotvorbe ciev - neovaskularizácii (Singh a kol., 2014). Zápalom aktivované leukocyty produkujú cytokíny a rastové faktory (VEGF, angiopoetín, TNF α , interleukíny a chemokíny), ktoré spôsobujú zvýšenú permeabilitu kapilár a indukujú procesy **neovaskularizácie** (Simó-Servat a kol., 2013). Novovzniknuté cievy sú fragilné, náchylné k prasknutiu. V literatúre sa uvádzajú pojmy **angiogenéza** a **neovaskularizácia**, pričom sa často zamieňajú. Neovaskularizácia znamená tvorbu krvných ciev *de novo*, pričom angioblasty (prekurzory endotelových buniek) migrujú vplyvom signálov na miesto určenia, diferencujú sa a tvoria cievy. **Angiogenéza** znamená tvorbu nových ciev z už existujúcich (Das, McGuire, 2003). Vo fáze, keď ischemia indukuje neovaskularizáciu v sietnici, DR prechádza do proliferatívneho štádia (Singh a kol., 2014). Počas proliferatívneho štádia dochádza aj k tvorbe fibrovaskulárnych pruhov a gliálneho väziva, ktoré rastie spolu s novými cievami smerom od sietnice do sklovca a svojim ťahom môžu v konečnom štádiu spôsobiť až odlúčovanie sietnice. Patofyziológia vzniku DR je zhrnutá na obr. 4.



Obr. 4 Patofyziológia vzniku diabetickej retinopatie.

EBM – endotelová bazálna membrána, HRB – hemato-retinálna bariéra, EB – endotelové bunky

Aspekty etiológie diabetickej retinopatie zostávajú neobjasnené. Je známe, že na rozvoj tohto degeneratívneho ochorenia majú vplyv environmentálne a genetické faktory. Pravdepodobnosť rozvoja a progresie DR úzko súvisí s trvaním diabetu (Yau a kol., 2012). Klinické štúdie *The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)* a *United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)* potvrdili významné prepojenie medzi chronickou hyperglykémiou a rozvojom DR (obr. 5). V prípade prísne kontrolovanej glykémie bolo riziko vzniku diabetickej retinopatie znížené o 76 % a riziko progresie o 54 % (Simó, Hernández, 2015). Mechanizmy, akými hyperglykémia „krok za krokom“ vyvoláva degeneratívne zmeny v sietnici, nie sú doposiaľ objasnené (Matthews a kol., 2004).



Obr. 5 Zvyšovanie incidence diabetickej retinopatie so zvyšujúcou sa mierou hyperglykémie.

Hladina glykémie je stanovená na základe množstva glukózy v krvi 2 hod po perorálnom podaní 75 g glukózy nalačno. decil – štatistická hodnota rozdeľujúca súbor na desiatinné celky, incidencia diabetickej

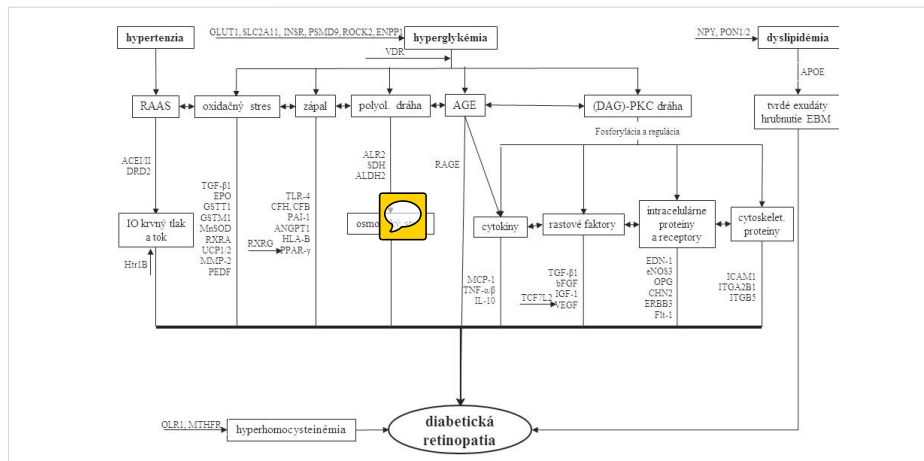
retinopatie (%) u diabetikov (upravené a preložené podľa The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus*: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183–1197.)

Objasniť úlohu hyperglykémie v patofyziológii DR pomáha zapojenie niekoľkých biochemických dráh: aktivácia dráhy diacylglycerol (DAG)-proteín kinázy C (PKC), zvýšená tvorba koncových produktov pokročilej glykácie (*Advanced Glycation End products - AGEs*), aktivácia **polyolovej dráhy**, zvýšená expresia **rastových faktorov** (VEGF, IGF-1), **renín-angiotenzín-aldosteronový systém** (RAAS), aktivácia leukocytov, subklinický zápal a tvorba cytokínov a reaktívnych metabolitov kyslíka (**oxidačný stres**). V striktnom slova zmysle sa pojem expresia týka len génu a vyjadruje realizáciu genetickej informácie v ňom kódovanú. V súčasných odborných textoch však došlo k osvojeniu termínu expresia aj v súvislosti s génovým produktom (RNA/proteínom).

Oxidačný stres je definovaný ako nerovnováha v procese oxidačno-redukčných reakcií v prospech oxidantov voči antioxidantom. Dôsledky oxidačného stresu môžu byť nenápadné (oxidačné poškodenie molekúl), alebo môžu viesť až k narušeniu bunkových signálnych dráh, a tým k bunkovej smrti - apoptóze (Lopes de Faria a kol, 2011). Oxidačný stres a zápal sú navzájom úzko prepojené deje. Bunky, ktoré sa zúčastňujú na zápale tvorbou reaktívnych foriem kyslíka, môžu vyvolať oxidačný stres. Na druhej strane oxidačný stres môže indukovať prozápalovú kaskádu sprostredkovanú NF-κB (nukleárny faktor κB), čo vedie k aktivácii ďalších prozápalových génov napr. génov pre TGF-β, NOX4, Nrf2, atď. (Kato a kol., 2013). Hypoxia tkaniva sietnice indukuje zvýšenú expresiu vaskulárneho rastového faktora (VEGF), erytropoetínu a cytokínov, čo vedie k fibroproliferácii a angiogéníze. K rozvoju retinopatie prispievajú aj abnormality na úrovni trombocytov a krvnej zrážanlivosti (Petrovič, 2013).

4. GENETICKÉ ASPEKTY DIABETICKEJ RETINOPATIE

Ďalšie rizikové faktory pre vznik DR sú **dyslipidémia** (Lim, Wong, 2012) a **vysoký krvný tlak**. Skutočnosti o nich, ako o možných rizikových faktoroch, sú však rozporuplné (Chew a kol., 2010; Matthews a kol., 2004). Arteriálna hypertenzia zvyšuje riziko poškodenia zraku v rámci DR o 72 % (Klein a kol., 2010). Dobre kontrolovaná hypertenzia redukuje progresiu retinopatie v 35 % prípadov, čiže je ešte účinnejšia ako dobre kontrolovaná glykémia (The UKPDS Study Group, 1998). Metabolické dráhy a patofyziologické deje, ktoré hrajú úlohu pri vzniku DR spoločne s relevantnými génmi sú zhrnuté v schéme (obr. 6), funkcie jednotlivých génov sú presnejšie opísané ďalej v texte.



Obr. 6 Predpokladané funkcie génov identifikovaných pomocou štúdií kandidátnych génov v patofyziologických procesoch uplatňujúcich sa počas diabetickej retinopatie.

RAAS - renín-angiotenzín-aldosterónový systém, AGEs – koncové produkty pokročilej glykácie, IO – intraokulárny, EBM – bazálna membrána endotelu, HRB – hemato-retinálna bariéra

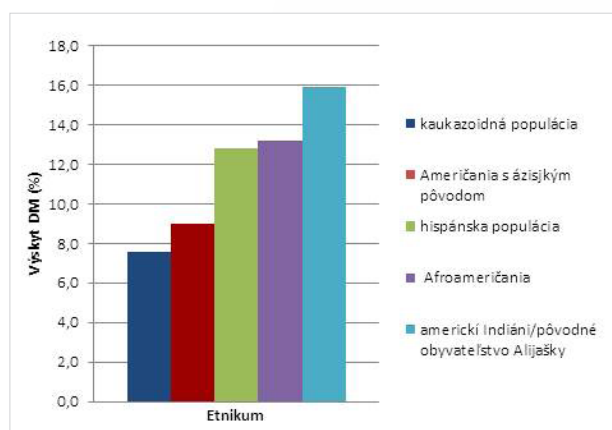
Na základe vyššie uvedeného môžeme zhrnúť, že hyperglykémia a s ňou súvisiace metabolické procesy vyvolávajú v sietnici oxidačný stres a subklinický chronický zápal, čo vedie k zvýšenej permeabilite ciev, poruchám krvnej zrážanlivosti, dysfunkcii endotelu, cievnej prestavbe, trombotizácii, ischemizácii tkaniva, následnej angiogenéze a neovaskularizácii (Petrovič, 2013; Dal, Sigrist, 2016). Dochádza k degenerácii sietnice a štrukturálnym zmenám vedúcim následne k poruche jej funkcie. Závažné poruchy zraku sú najčastejšie spôsobené krvácaním v priestore pred sietnicou alebo krvácaním do kavít sklovca z novovytvorených ciev, či vplyvom diabetickeho edému žltej škvrny (Ng, 2000).

S pribúdajúcimi pokrokmi molekulárnej biológie sa vo svete identifikuje stále viac prípadov tzv. monogénovej cukrovky, ktorá je spôsobená mutáciou (zmenou genetickej informácie) jedného konkrétneho génu. Monogénovo podmienené ochorenia sú spôsobené mutáciou len v jednom gène a prostredie prispieva k rozvoju ochorenia minimálne. V takýchto prípadoch má v diagnostike dôležitú úlohu genetika. Podľa poškodeného génu a typu mutácie sa dá v mnohých prípadoch zvoliť pre konkrétneho pacienta optimálna, a teda najúčinnejšia liečba s minimom nežiaducich účinkov. Na identifikáciu mutovaného génu sú používané štandardné metódy DNA analýzy. Výskyt monogénovej cukrovky je však mimoriadne raritný. Medzi monogénovú cukrovku zaraďujeme **cukrovku typu MODY** (*Maturity Onset Diabetes of the Young*), novorodeneckú cukrovku (neonatálny *diabetes mellitus*) a cukrovku s mimopankreatickými príznakmi (Gašperíková a kol., 2009). Naproti tomu pri DR sa jednomyselne akceptuje multifaktoriálna dedičnosť (fenotypový znak je vytvorený spolupôsobením viacerých génov a prostredia), pričom väčšina rizikových génov a génových variantov doteraz nebola identifikovaná. Výskum sa zameriava nielen na sledovanie samotných génov, ale aj na úlohy faktorov vonkajšieho prostredia. Preto sa pri DNA analýze DR musia využívať najmodernejšie metodické postupy molekulárnej genetiky, ako sekvenovanie novej generácie a čipová technológia, ktoré nedetegujú iba samostatné gény, ale umožňujú celogenómové prístupy.

Hlavným cieľom molekulárnych biológov je samotná identifikácia zúčastnených génov a ich variantov, ktoré sa priamo podieľajú na patogenéze DR, a takisto identifikácia genetických markerov. Tieto markery by umožnili vytypovať pacientov so zvýšenou náchylnosťou (predispozíciou) k vzniku DR ešte v predklinickom štádiu a pacientom by sa mohli aplikovať efektívne preventívne postupy. Je totiž jednoznačne dokázané, že čím skoršie je štádium kedy sa retinopatia zachytí, tým sú preventívne zákroky efektívnejšie a v konečnom dôsledku môžu zachrániť zrak pacienta.

Vyššie spomenuté rizikové faktory (hyperglykémia, hypertenzia, dyslipidémia,...) nie sú výhradne zodpovedné za pravdepodobnosť rozvinutia diabetickej retinopatie. Klinic-

ké štúdie ukazujú podstatné rozdiely vo vzťahu medzi dobou vzniku retinopatie a jej klinickou závažnosťou, pretože nie vždy je retinopatia asociovaná s rizikovými faktormi, akými sú trvanie diabetu, miera kontroly glykémie alebo sprievodné vaskulárne ochorenia (Yang a kol., 2010). DR sa môže rozvinúť napríklad aj u pacientov s dobrou glykemickou kontrolou a s krátkym trvaním diabetu. Naopak, u niektorých pacientov dlhodobo trpiacich na diabetes a so slabou kontrolovanou glykémiou sa DR vôbec nemusí objaviť (Sun a kol., 2011). Na riziko rozvoja DM, a následne aj DR vplývajú aj etnické faktory. Hispánci, ľudia s africkými koreňmi a Ázijci sú všeobecne náchylnejší na vznik retinopatie (Wong, a kol., 2006; Zhang a kol., 2010) (obr. 7).



Obr. 7 Výskyt DM v rôznych etnikách. DM - diabetes mellitus (upravené a preložené podľa Iné zdroje - odkaz 3)

Znaky retinopatie, vrátane mikroaneuryziem v sietnici, boli pozorované aj u pacientov bez diabetu a s optimálnymi hladinami glukózy v krvi (menej ako 5 % glykovaného hemoglobínu) (Wong a kol., 2008). Tieto zmeny ciev sietnice boli na nerozoznanie od lézií typických pre DR. Z uvedeného vyplýva, že okrem spomínaných rizikových faktorov v rozvoji a progresii DR zohrávajú úlohu aj neznáme genetické predispozície, pričom môžu byť nezávislé od diabetu. Tieto skutočnosti sádajú považovať za zreteľný dôkaz vplyvu genetických faktorov v patogenéze DR. Vďaka neustálemu pokroku na poli genetiky došlo v ostatnom období k získaniu nových poznatkov v oblasti identifikácie lokusov asociovaných s DR prostredníctvom **gemelologických štúdií** (*twin studies*), **genealogických štúdií** (*family studies*), **väzbových štúdií** (*linkage studies*), **štúdií kandidátnych génov** (*candidate gene studies*) a vďaka **celogenómovým asociačným štúdiám**, tzv. **GWAS** (*genome-wide association studies*). Lokus je lokalizácia génu na konkrétnom mieste chromozómu. Štúdium dvojčiat a rodín viedlo k zisteniu, že riziko vzniku DR je trikrát vyššie u pacientov s výskytom DR v rodine, čo platí pre oba typy diabetu. Konkordancia je zhoda určitého znaku/znakov v skúmanej populácii, pričom sa najčastejšie porovnávajú monozygotné dvojčatá s identic-

kou DNA s dizygotnými dvojčatami, ktorých DNA je zhodná na 50 %. **Konkordancia** diabetickej retinopatie je dramaticky vyššia u monozygotných dvojčiat v porovnaní s dizygotnými (Kuo, 2014). Jedna z prvých gemelologických štúdií ju stanovila pri DM1 68 % a pri DM2 95 % (Leslie, Pyke, 1982). Heritabilita, dedivosť, udáva, aká časť znaku je daná genetickými faktormi. Heritabilita retinopatie vzrastá priamo úmerne s jej závažnosťou (Arar a kol., 2008). Pre DR je to celkovo 18 % a pri PDR vzrastá na 52 % (Looker a kol., 2007).

4.1. ŠTÚDIUM KANDIDÁTNÝCH GÉNOV

Na základe poznatkov o patofyziológii DR je možné navrhnúť kandidátne gény podieľajúce sa na vzniku a rozvoji DR. Metóda identifikácie kandidátnych génov je založená na porovnávaní frekvencie konkrétného genetického variantu u jednotlivcov s ochorením alebo bez ochorenia, v tomto prípade s DR. Takýmto prístupom sa podarilo odhaliť niekoľko potenciálne kauzálnych génov zodpovedných za progresiu ochorenia. Produkty týchto génov sú súčasťou rôznych fyziologických a patofyziologických procesov v organizme a často sú asociované so zápalom. Patria k nim komponenty RAA systému, glukózou indukovaných biochemických dráh, remodelácie extracelulárneho matrixu (ECM), dysfunkcie endotelu ciev a angiogenézy. Potenciálne dôležité gény, ktoré kódujú produkty týchto dráh, sú gén pre *aldózoreduktázu* (*AKR1B1*), *sorbitoldehydrogenázu* (*SDH*), *mitochondriovú aldehyddehydrogenázu 2* (*ALDH2*), *angiotenzín konvertujúci enzým* (*ACE*), *receptor pre angiotenzín II typu 1* (*AGTR1*), *angiotenzinogén* (*AGT*), *vaskulárny endotelový rastový faktor* (*VEGF*), *receptor pre koncové produkty pokročilej glykácie* (*RAGE*), *glukózový transportér 1* (*GLUT1*), *apolipoproteín E* (*APOE*), *metyléntetrahydrofolátreduktáza* (*MTHFR*), *inhibitor aktivátora plazminogénu 1* (*PAI-1*), *$\alpha 2\beta 1$ integrín* (*ITGA2B1*), *peroxizómovým proliferátorom aktivovaný receptor gama* (*PPAR- γ*), *glutatión S-transferázu M1 a T1* (*GSTM1*, *GSTT1*), *endotelovú syntázu oxidu dusnatého* (*eNOS3*), *glyoxalázu I* (*GLOI*), *superoxiddismutázu II* (*SOD II*) a pre mnoho ďalších (Radha a kol., 2002; Liew a kol., 2009; Ng, 2010; Abhary a kol., 2009; Wu a kol., 2011). V nomenklatúre génov a ich produktov je zaužívané písanie názvov génov kurzívou a proteínových produktov bez kurzívy. Zápis genetických zmien, v tomto prípade substitúcií, v sledovanej sekvencii obsahuje:

- c./p. – kódujúca sekvencia nukleotidov (c.) alebo sekvencia aminokyselín (p.)
- nukleotid v štandardnej alele (A pre adenín, T pre tymín, G pre guanín a C pre cytozín)

- pozícia zmeneného nukleotidu - + za prvým kódujúcim nukleotidom, - pred prvým kódujúcim nukleotidom
- mutančný nukleotid

Predpokladá sa, že patologické procesy vedúce k DR sú, okrem vyššie menovito uvedených génov, ich produktov a metabolických a signálnych dráh, v ktorých vystupujú, podmienené veľkým počtom ďalších génov a faktorov so slabým účinkom. Gény a ich polymorfizmy sú zhrnuté v tabuľke 1. Najčastejšie polymorfizmy sú typu **SNP** (*single nucleotide polymorphism* – jednonukleotidový tzv. bodový polymorfizmus, kedy sa jedinici v určitom mieste v genóme líšia jedinou bázou). Poukázalo sa iba na gény, ktorých zmena expresie alebo funkcie bola pozorovaná počas progresie DR, alebo gény, kde boli detegované DNA polymorfizmy štatisticky významne asociované s DR. Koniec tabuľky tvoria gény s identifikovanými polymorfizmami, ktorých účasť na patofyziologických procesoch v rámci DR nie je doposiaľ objasnená.

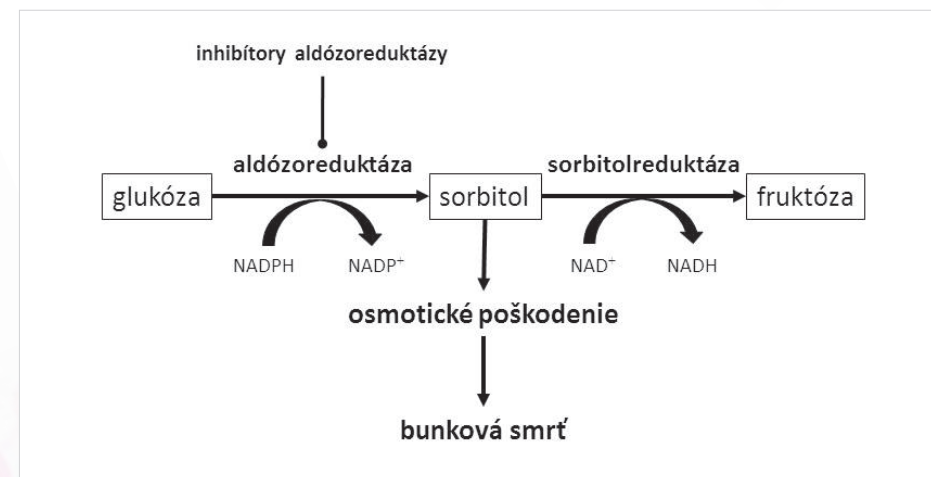
4.1.1. POLYOLOVÁ DRÁHA

Pri nedostatku inzulínu nemôže byť glukóza spracovaná normálnou metabolickou cestou. Aktivujú sa procesy, ktoré ku spracovaniu glukózy inzulín nevyžadujú. Produktami aberantného metabolizmu sú glykované proteíny, sorbitol a fruktóza, ktoré sa všetky uplatňujú v patogenéze vzniku špecifických komplikácií diabetu (Hulín a kol., 2002).

Polyolová dráha predstavuje hlavné metabolické prepojenie medzi hyperglykmiou a poškodením spôsobeným diabetom. **Aldózoreduktáza 2 (ALR2)** je jej kľúčovým enzýmom. ALR2 konvertuje glukózu na sorbitol v NADPH závislej reakcii (obr. 8). Aktivita polyolovej metabolickej dráhy závisí od hladiny glukózy v krvi (Mohan a kol., 2011). Sorbitol sa akumuluje v bunkách a svojimi osmotickými vlastnosťami spôsobuje poškodenie buniek siete (Kinoshita, 1990; Barnett a kol., 1986). Následne dochádza k tvorbe mikroaneuriziem, k hrubnutiu bazálnej membrány endotelových buniek a k strate pericytov, ktoré neskôr vyúsťujú v neovaskularizáciu/angiogézu, ako sa potvrdilo v experimentálnych animálnych modeloch. Tieto znaky sú však typické aj pre ľudí (Kinoshita, 1990). V rôznych ľudských populáciách boli v *ALR2* géne identifikované

3 polymorfizmy asociované s diabetickou retinopatiou (tabuľka 1). Prvý polymorfizmus je lokalizovaný na 5'konci génu. Zatiaľ čo Z-2 alela (CA)_n mikrosatelitu zvyšuje riziko vzniku DR, Z+2 a Z alely preukázali protektívny účinok pri rozvoji retinopatie (Abhary a kol., 2009). Znamienko + alebo – vyjadruje zmenu počtu CA opakovaní v porovnaní s alelou štandardného typu (tiež z angl. *wild type*, čo je bežne sa vyskytujúca alela v populácii). U diabetikov s DM1 vykazuje T alela polymorfizmu rs759853 protektívny účinok (Abhary a kol., 2009; Ng, 2010). Skratka **rs** v označení polymorfizmu znamená *reference SNP* a je to forma identifikačného kódu v **dbSNP** (*Single Nucleotide Polymorphism Database*).

Napriek tomu, že aldózoreduktáza figuruje v patogenéze retinopatie, použitie inhibítorov aldózoreduktázy nepotvrdilo predpokladané výsledky klinických štúdií (Mohamed a kol., 2009). Dané štúdie však nebrali do úvahy genetické varianty nachádzajúce sa v *ALR2* géne, čo mohlo mať negatívny dopad na účinnosť inhibítorov.



Obr. 8 Polyolová metabolická dráha.

- inhibícia, NADP⁺ - nikotínamidadenín dinukleotidfosfát, NAD⁺ – nikotínamidadenín dinukleotid (upravené a preložené podľa Iné zdroje – odkaz 4)

Ďalším dôležitým enzýmom polyolovej dráhy je **sorbitoldehydrogenáza** (SDH), ktorá konvertuje sorbitol na fruktózu v reakcii závislej od NAD⁺ (nikotínamidadenín dinukleotid). Nadmerná expresia (nadexpresia, overexpresia) SDH zvyšuje toxický efekt glukózy

na kultivované pericyty sietnice, čo vedie k ich zvýšenej strate, znaku typickému pre diabetickú retinopatiu (Amano a kol., 2003). V poľskej, japonskej, kaukazoidnej a brazílskej populácii boli v géne kódujúcom SDH identifikované rs2055858 a rs3759890 polymorfizmy. Predpokladá sa, že tieto dva polymorfizmy ovplyvňujú aktivitu promotora *SDH* génu a hrajú úlohu v nástupe DR (Amano a kol., 2003; Szaflík a kol., 2008). Promótor je fylogeneticky veľmi konzervatívna sekvencia DNA, ktorá sa nachádza pred samotným génom. Je to regulačná oblasť génu, na ktorú sa viaže RNA polymeráza, transkripčné faktory a transkripčný aparát. Až po ich naviazaní sa začne transkripcia (prepis) génu z DNA do mRNA.

Mitochondriová aldehyddehydrogenáza 2 (*ALDH2*) je exprimovaná v cievach, a jej produkt detoxikuje reaktívne formy aldehydov, ktoré vznikajú z glukózy a lipidov, a tým zabráňuje tvorbe koncových produktov pokročilej glykácie – AGEs. Bola popísaná aj súvislosť medzi alelou *ALDH2*2* a výskytom retinopatie (Morita a kol., 2013).

4.1.2. RECEPTOR PRE KONCOVÉ PRODUKTY POKROČILEJ GLYKÁCIE

Glykácia proteínov je neenzýmovo vytvorená väzba medzi voľnou aminoskupinou proteínu a karbonylovou skupinou glukózy, pričom vznikajú **AGEs**, tzv. **koncové produkty pokročilej glykácie**. Hladina glykovaných produktov je priamo úmerná hodnotám glykémie (Mohan a kol., 2011). K bielkovinám, na ktorých počas diabetu prebiehajú glykačné zmeny, patria hemoglobín, kryštalické proteíny šošovky a bielkoviny bazálnej membrány. Pravidelným monitorovaním hladiny glykovaného hemoglobínu v krvi sa zisťuje, či sú hladiny glukózy dlhodobo pod kontrolou. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) už neodporúča HbA1C ako kritérium diagnostiky diabetu (nahradené meraním množstva glukózy v sére pri hladovaní alebo 2 hod po orálnom podaní 75 g glukózy nalačno). Zdraví jedinci majú HbA1C na úrovni 5-8 % z celkového množstva HbA. Glykovaný hemoglobín má vyššiu afinitu voči kyslíku, preto sa pri zvýšenej koncentrácii HbA1C v krvi môže objaviť hypoxia následkom jeho zhoršeného uvoľňovania do tkanív. Prejavuje sa to najmä v tkanivách so zvýšeným nárokom na kyslík, ku ktorým patrí aj sietnica (Hulín a kol., 2002). Ak sa pacientovi s kompenzovaným diabetom typu 1 podarí udržať hladinu HbA1C pod 7,6 %, môže to oddialiť vznik proliferatívneho štádia retinopatie až o 20 rokov (Nordwall a kol., 2015). V prípade proteí-

nov s dlhou životnosťou, ako napr. kolagén, ich glykáciou a ďalšou modifikáciou vznikajú AGEs. Tieto zmeny sú ireverzibilné (Mohan a kol., 2011). Akumulácia AGEs v tkanive vedie k jeho poškodeniu. Vznikom kovalentných väzieb medzi proteínmi dochádza k zhrubnutiu bazálnej membrány kapilár, následne k poruche ich štruktúry a funkcie (Tarr a kol., 2012). Glykácia proteínov v membráne erytrocytov vyvoláva stratu pružnosti a poddajnosti a ich zvýšenú adhezivitu (prilnavosť), čo sťažuje pohyb krvi v kapilárach. Glykácia membránových proteínov trombocytov zvyšuje ich agregáčnú schopnosť, čo vedie k zvýšenej pravdepodobnosti vzniku mikrotrombov (zhluk trombocytov a fibrínu) v mikrocirkulácii (Hulín a kol., 2002).

Ďalšou vlastnosťou AGEs je schopnosť interagovať s rozličnými povrchovými receptormi, ku ktorým patria napr. **receptor pre koncové produkty pokročilej glykácie (RAGE)**. RAGE je transmembránový receptor imunoglobulínov a ich aktivácia vedie k sekrécii cytokínov. Cytokíny urýchľujú rozvoj diabetických komplikácií podporovaním prozápalových procesov a zvyšovaním endotelovej permeability (Goldin a kol., 2006). Hladiny cytokínov v sklovci korelujú so štádiom retinopatie (Hernández a kol., 2005). AGEs je možné nájsť v cievach sietnice diabetických pacientov, kde ich hladiny korelujú s hladinami v sére, a taktiež so závažnosťou retinopatie (Zong a kol., 2011). V kaukazoidnej a indickej populácii sú polymorfizmy rs1800624 (c. T-374A), rs2070600 (p. Gly82Ser) a rs1800625 (c. T-429C) v géne *RAGE* asociované s diabetickou retinopatiou (Lindholm a kol., 2006; Ramprasad a kol., 2007; Kumaramanickavel a kol., 2002; Hudson a kol., 2001). V čínskej populácii tento vzťah potvrdený nebol (JiXiong a kol., 2003).

TNF- α (tumor nekrotizujúci faktor alfa, faktor nádorovej nekrózy α) je multifunkčný prozápalový cytokín, ktorý zvyšuje expresiu adhezívnych molekúl, aktivuje leukocyty, zvyšuje ich migráciu, indukuje apoptózu. Moduluje odpoveď imunitného systému prostredníctvom stimulácie exprese rôznych transkripčných faktorov, rastových faktorov a iných zápalových mediátorov (Sesti a kol., 2015). TNF- α inhibuje produkciu proteínov tesných spojov endotelových buniek (*tight junction*, nazývaných aj **Zonula occludens**) a zúčastňuje sa na rozpade HRB. V animálnych experimentoch myši s genetickým deficitom pre TNF- α vykazovali zníženú mieru permeability kapilár a leukostázu (Huang a kol., 2011). Podávanie inhibítora TNF- α , napr. etanercept, pegsunercept, viedli k rovnakým pozorovaniam. U potkanov sa zistila miernejšia forma degradácie kapilár a nižšia miera straty pericytov (Simó, Hernández, 2015). U zvierat, ako aj u pacientov s diabetom, boli v sietnici, sklovci aj v sére pozorované zvýšené množstvá TNF- α , pri PDR sú dokonca výraznejšie (Sesti a kol., 2015). Podľa našich poznatkov neexistujú žiadne

prebiehajúce klinické štúdie na ľudských diabetických pacientoch zaoberajúce sa efektivitou inhibítorov TNF- α pri DR. Z výsledkov genetických štúdií sa zistilo, že genotyp AA polymorfizmu rs361525 génu TNF- α môže u indickej populácie zvyšovať riziko proliferatívneho štádia retinopatie, v kaukazoidnej brazílskej populácii je polymorfizmus rs1800629 génu TNF- α s proliferatívnym štádiom retinopatie preukázateľne asociovaný (Kumaramanickavel a kol., 2001; Paine a kol., 2012; Sesti a kol., 2015).

Interleukín 10 (IL-10) je cytokín s pleiotrofným účinkom v imunitných procesoch, hlavne v kaskáde zápalových reakcií. U pacientov s diabetom typu 2 dochádza k neadekvátnej sekrécii IL-10 (Dong a kol., 2015). Injekčné podávanie IL-10 myšiam znižovalo incidenciu diabetu, naopak nízke hladiny IL-10 boli asociované so zvýšeným množstvom HbA1C a zvýšenou hladinou glukózy v krvi (Dong a kol., 2015). Nízke hladiny cirkulujúcich IL-10 môžu viesť k imunitnej dysfunkcii a eventuálne spúšťať proces diabetickej retinopatie. Polymorfizmus n. A-1082G bol opísaný ako možný rizikový faktor rozvoja PDR (Paine a kol., 2012).

4.1.3. RASTOVÉ FAKTORY

Vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF) je jedným z hlavných faktorov vyvolávajúcich proces neovaskularizácie a angiogenézy, zároveň ovplyvňuje permeabilitu kapilár endotelových buniek. VEGF je u diabetikov aktivovaný mikrovaskulárnymi zmenami, hypoxiou tkanív, hyperglykémiou (Simó-Servat a kol., 2013). Indukovaním rozpadu komplexov medzibunkových spojení prispieva k deštrukcii hemato-retinálnej bariéry, indukuje rozvoj diabetickeho makulárneho edému a neovaskularizáciu (Aiello, 2005). U pacientov s PDR sú prítomné zvýšené hladiny VEGF v sére aj v sklovci (Sydorova, Lee, 2005). Anti-VEGF terapie vedú k zlepšeniu zdravotného stavu pacientov a znižujú proces proliferácie ciev sietnice (Stewart, 2012). Je známych niekoľko kandidátnych DNA polymorfizmov v promótoré génu VEGF, ktoré majú vzťah k vzniku diabetickej retinopatie. Najvýznamnejšie z nich sú: rs2010963, rs25648, rs1570360, rs3095039, rs35569394, rs699947, rs13207351, rs735286, rs2146323, rs833061, rs302502, rs10434, rs833068 a rs833070 (Abhary a kol., 2009; Churchill a kol., 2008; Abhary a kol., 2009; Nakanishi a kol., 2009). V japonskej a indickej populácii je polymorfizmus rs2010963 (-634C/G) asociovaný s DR, v japonskej populácii je asociovaný dokonca so zvýšeným rizikom vzniku edému makuly. G alela má štatisticky významný protektívny účinok na vznik NPDR u pacientov s diabetom typu 2 (Awata a kol., 2002; Awata a kol., 2005; Uthra a kol., 2008). Neustále sa objavujú ďalšie štúdie identifikujúce nové polymorfizmy vo VEGF géne, čo potvrdzuje významnosť tohto génu v rozvoji DR.

Ďalšie rastové faktory s možnou funkciou v patogenéze DR sú **fibroblastový rastový faktor (bFGF)** a **rastový faktor podobný inzulínu 1 (IGF-1)**. **Fibroblastový rastový faktor (bFGF)** je potrebný pri regenerácii tkanív, raste buniek a morfogénéze. Podieľa sa na rozvoji angiogenézy a predpokladá sa jeho vplyv na produkciu VEGF. U pacientov s PDR boli pozorované zvýšené hladiny bFGF. **Rastový faktor podobný inzulínu 1 (IGF-1)** je hormón svojou štruktúrou podobný inzulínu. Reguluje proliferáciu a diferenciáciu buniek rôznych typov tkanív. Hladiny IGF-1 v sklovci sú významne zvýšené u pacientov s diagnostikovanou PDR v porovnaní s kontrolnou skupinou jedincov (Semeraro a kol., 2015). Genetické varianty identifikované v spomínaných génoch sú zhrnuté v tabuľke 1.

K ďalším transkripčným faktorom, ktoré regulujú expresiu VEGF počas oxidačného stresu, typického spúšťača patofyziologických procesov DR, patria napríklad HIF-1 α , STAT3 a ATF4. Vzťah medzi spomínanými rastovými faktormi a retinopatiou zatiaľ nebol preskúmaný (Goto a kol., 2008).

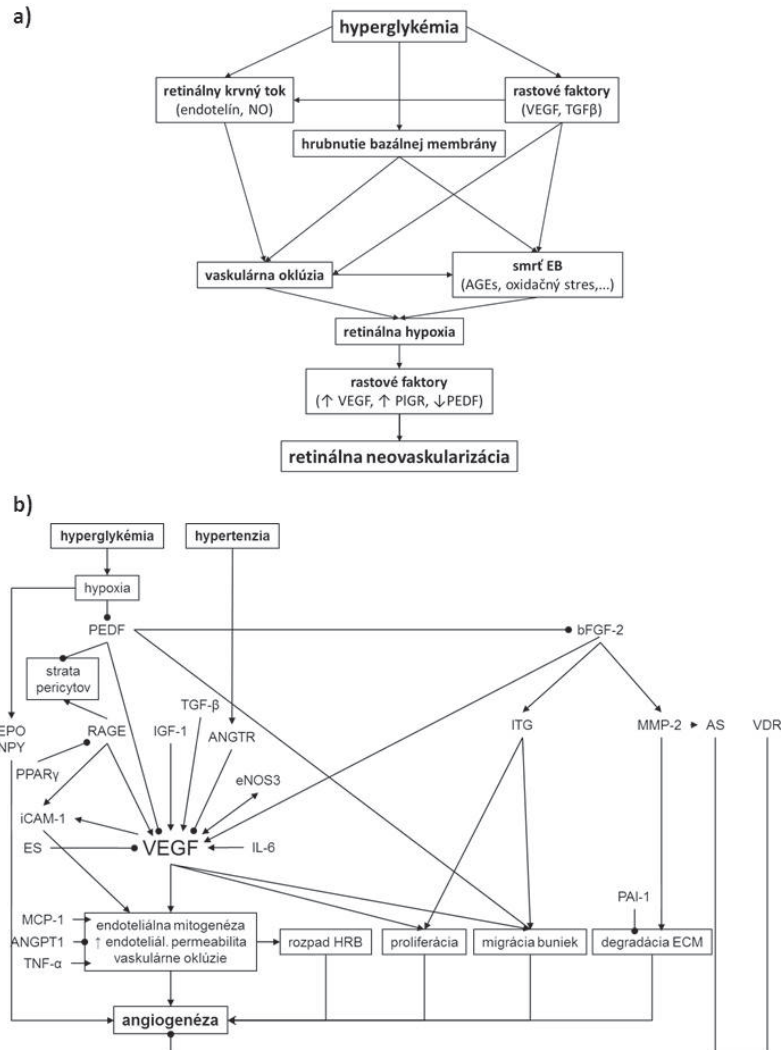
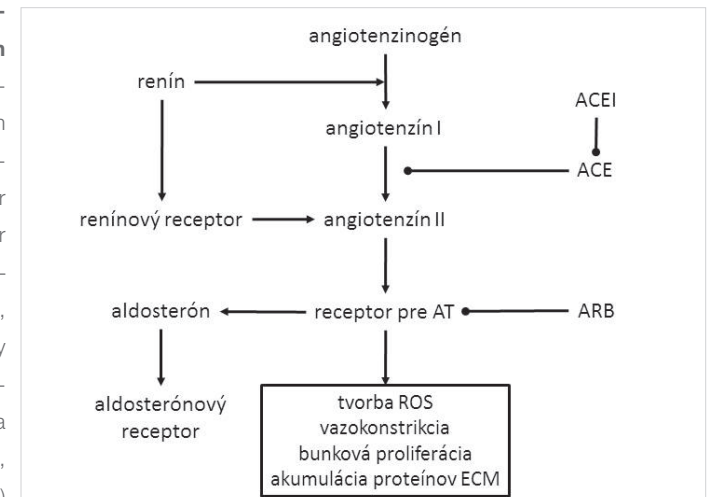
Erytropoetín (EPO), hormón podporujúci tvorbu červených krviniek, hrá dôležitú úlohu v stimulácii kmeňových buniek v kostnej dreni, v proliferácii a migrácii buniek endotelu ciev, ako aj v procese angiogenézy v tkanivách vystavených hypoxii. U pacientov s rozvinutou PDR boli v sklovci pozorované zvýšené koncentrácie erytropoetínu (Abhary a kol., 2010). Ukázalo sa, že jeho účinok je skôr protektívny než patogénny. Podávanie nízkych dávok erytropoetínu diabeticým potkanom inhibuje oxidačný stres a skoré zmeny v cievach ich sietnice (Wang a kol., 2010). V pokročilých štádiách DR môže EPO zosilovať expresiu VEGF, ktorá je v hypoxických podmienkach už dosť vysoká, a prispieť tým k neovaskularizácii a zhoršeniu stavu (Grant a kol., 2008). Dve nezávislé štúdie zisťovali súvislosť medzi polymorfizmami rs1617640, rs507392, a rs551238 v géne pre EPO a rozvojom DR. Priniesli však rozdielne zistenia. V americkej populácii európskeho pôvodu je haplotyp (skupina génov, ktoré sú vo väzbe a preferenčne sa dedia spoločne) TTA rizikovým faktorom, zatiaľ čo v austrálskej populácii je so vznikom DR asociovaný GCC haplotyp (Tong a kol., 2008; Abhary a kol., 2010).

Proces angiogenézy v rámci patogenézy diabetickej retinopatie zahŕňa vzájomné interakcie rastových faktorov, cytokínov, bunkových signálnych molekúl a extracelulárnej matrix (Quazi, a kol., 2009), v ktorom VEGF zohráva pomerne kľúčovú úlohu (Abcouwer, 2013) (obr. 9).

4.1.4. DEREGULÁCIA RENÍN-ANGIO-TENZÍN-ALDOSTERÓNOVÉHO SYSTÉMU

Renín-angiotenzín-aldosterón systém (RAAS) je endokrinný systém zapojený do regulácie krvného tlaku a hospodárenia organizmu s tekutinami. **Angiotenzín konvertujúci enzým (ACE)** konvertuje **angiotenzín I (ATI)** na **angiotenzín II (ATII)**, následne sa aktiváciou **receptorov pre angiotenzín ANGTRI a ANGTRII** sprostredkúva jeho hemodynamický efekt (obr. 10). Diabetickí pacienti vykazujú poruchy regulácie RAAS na úrovni enzýmov a receptorov. Prevažná väčšina účinkov RAAS na organizmus je sprostredkovaná **angiotenzínom II**. Angiotenzín II reguluje intraokulárny krvný prietok a tlak, prispieva k novotvorbe kapilár v oku, má proonkogénny vplyv na rast buniek, zvyšuje permeabilitu kapilár, podieľa sa na vzniku reaktívnych metabolitov kyslíka a ovplyvňuje expresiu viacerých rastových faktorov vrátane VEGF, IGF-1 a PDGF (Abhary a kol., 2009). V sietnici pacientov s PDR sú ACE a angiotenzínové receptory prítomné vo zvýšenej miere, a to nezávisle od hodnot krvného tlaku (Wilkinson-Berka, 2006). U pacientov s DR sa namerali v sklovci zvýšené hladiny ATII (Funatsu a kol., 2002). Polymorfizmus *ACE I/D* (inzercia/delécia 287 bp dlhjej Alu sekvencie v intróne 16) môže byť asociovaný s rozvojom DR (Zhou, Yang, 2010). Alu sekvencie sú špecifické pre človeka (primáty), patria medzi rozptýlené sekvencie v génoме a nazývajú sa podľa restričného enzýmu *AluI*, ktorý ich štiepi.

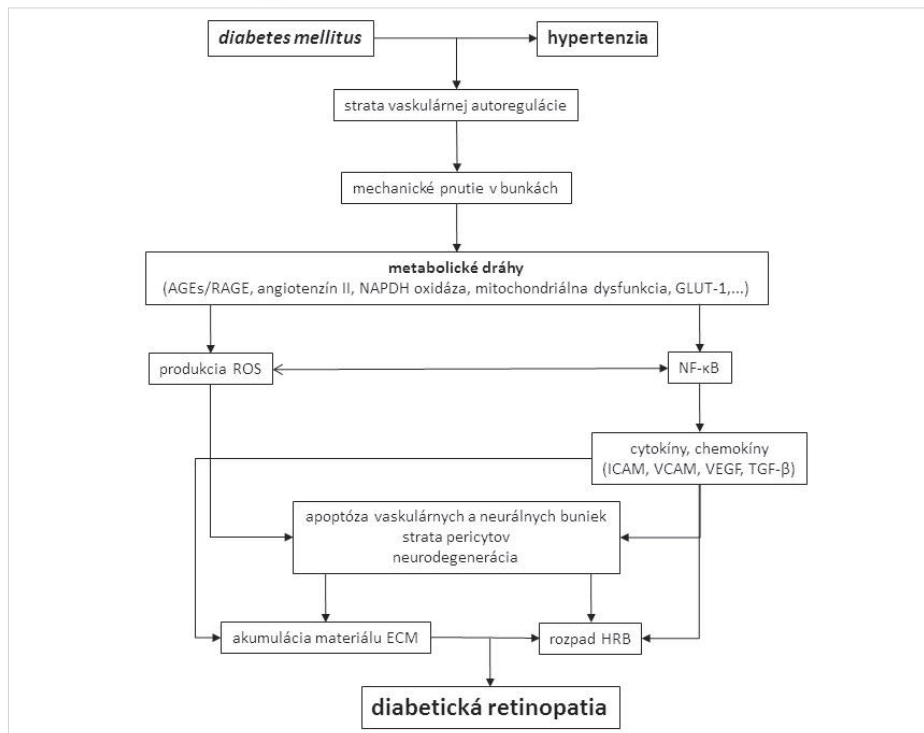
Obr. 10 Renín-angiotenzín-aldosterón systém. AT – angiotenzín, ACE – enzým konvertujúci angiotenzín, ACEI – inhibitor ACE, ARB – blokátor receptora pre AT, ROS – reaktívne formy kyslíka, ECM – extracelulárny matrix, • – inhibícia (upravené a preložené podľa Declèves, Sharma, 2010)



Obr. 9 a) Vplyv hyperglykémie na neovaskularizáciu v sietnici (upravené a preložené podľa Cai, Boulton (2002). **b) Gény s identifikovanými DNA polymorfizmami zapojené do angiogenézy v patogeneze DR.** AS – angiostatín, ES – endostatín, HRB – hemato-retinálna bariéra ECM – extracelulárny matrix, • – inhibícia

4.1.5. INÉ POLYMORFIZMY KANDIDÁTNYCH GÉNOV OVPLYVŇUJÚCE RIZIKO VZNIKU DIABETICKEJ RETINOPATIE

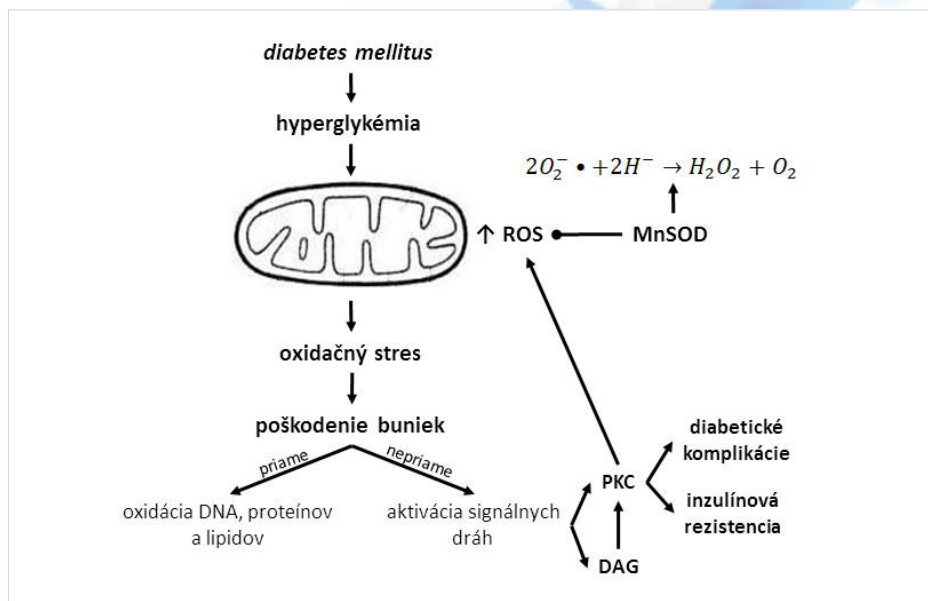
ACE inhibítory (ACEI), teda blokátory angiotenzínových receptorov, redukujú u pacientov s DM1 vznik a progresiu DR zabraňovaním procesu neovaskularizácie. Predpokladá sa, že ACE je zapojený do aktivácie PKC (proteín kinázy C) (Sjölve a kol., 2008, Chaturverdi a kol., 2008). Hyperglykémia indukuje zvýšenú produkciu DAG, ktorý je endogénny aktivátor PKC. PKC indukuje fosforyláciu viacerých substrátových proteínov, čo spúšťa kaskádu patofyziologických procesov. Počas DR, PKC sprostredkováva zmeny v endotelovej permeabilite, krvnom toku, produkcii angiogénnych faktorov, prispieva k retinálnemu presakovaniu, ischemii, neovaskularizácii, a aj strate pericytov (viď obr. 4). Vplyvom prepojenia signalizácie medzi dráhami, aktivácia PKC dráhy zosilňuje odpovede aj iných patofyziologických faktorov, ako je hypoxia, oxidačný stres či aktivita RAAS (Donnelly a kol., 2004). Vplyv hypertenzie na rozvoj DR je zhrnutý na obr. 11.



Obr. 11 Vplyv diabetes mellitus a hypertenzie na rozvoj diabetickej retinopatie. AGEs – koncové produkty pokročilej glykácie, RAGE – receptor pre AGE, ROS – reaktívne formy kyslíka, ECM – extracelulárny matrix, HRB – hemato-retinálna bariéra (upravené a preložené podľa Lopes de Faria a kol., 2011)

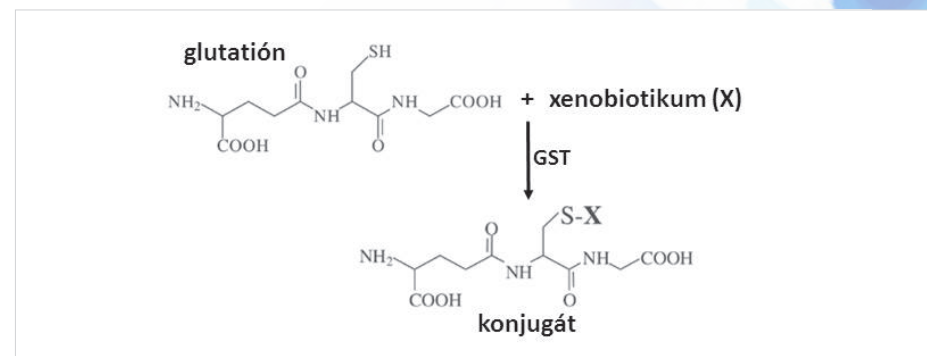
Hyperglykémia indukuje oxidačný stres zvyšovaním produkcie reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Oxidačný stres je významne zapojený do patogenézy DR, pretože práve sietnica je výrazne náchylná na oxidačné poškodenie. Značné množstvo ROS vzniká v mitochondriách a vplyvom oxidačného stresu dochádza k nezanedbateľnému poškodeniu mitochondriálnej DNA. Poškodenie mitochondrií môže viesť k narušeniu funkcie buniek a tkanív, čo prispieva k rozvoju retinopatie (Jarret a kol., 2008). Endogénne antioxidačné obranné mechanizmy (enzymatické aj neenzymatické dráhy) zmierňujú účinky oxidačného poškodenia. K bežným antioxidantom patria vitamíny A, C a E, glutatión, enzýmy superoxiddismutáza, kataláza a glutatiónreduktáza (Kowluru, Chan, 2007). Práve na detoxifikačné enzýmy sa zameriavajú kandidátne štúdie.

V mitochondriách lokalizovaná **Mn-superoxiddismutáza (MnSOD)** viaže mangán, zabraňuje nadmernej produkcii ROS premenou superoxidových radikálov na peroxid vodíka a ochraňuje endotelové bunky sietnice pred oxidačným poškodením (Vanita, 2014). Nadexpresia **MnSOD** v transgénnych myšiach (transgénne myši sú geneticky modifikované, vo svojom genóme majú aj cudzorodú DNA) viedla k zníženiu množstva produkovaných ROS, čo inhibovalo PKC dráhu aktivovanú hyperglykémiou, a tým sa znížila tvorba AGEs a akumulácia sorbitolu v bunkách. ROS sa aktiváciou PKC dráhy produkujú, a zároveň ROS pôsobia ako aktivátor PKC (obr. 12). Nadexpresia MnSOD súčasne znižuje expresiu VEGF a fibronektínu v sietnici diabetických myši (Goto a kol., 2008). Polymorfizmus génu *MnSOD* rs4880 (c. C47T, p. A16V) má vplyv na efektivitu mitochondrií v boji s oxidačným stresom. Vo viacerých štúdiách bol zistený jeho vzťah k vzniku DR (Tian a kol., 2011; Kangas-Kotio a kol., 2009; Petrovič a kol., 2008).



Obr. 12 Aktivácia PKC signálnej dráhy vplyvom oxidačného stresu počas diabetu a funkcia MnSOD v produkcii ROS. • inhibícia, PKC – proteínkináza C, MnSOD - Mn–superoxiddismutáza, ROS – reaktívne formy kyslíka, DAG – diacylglycerol (upravené a preložené podľa Giorgi a kol., 2010)

Glutatión S-transferáza (GST) sa podieľa na detoxikácii organizmu tým, že katalyzuje konjugáciu redukovanej formy glutatiónu (GSH) so xenobiotickými toxickými látkami, čím zvyšuje ich hydrofilnosť, a tým uľahčuje ich vylúčenie z bunky (obr. 13) (Oakley, 2011). V patogenéze diabetu zohráva dôležitú úlohu oxidačné poškodenie tkanív a pacienti majú často poruchy na úrovni glutatiónového metabolizmu. U kaukazoidnej populácie s diabetom typu 2 sa v porovnaní s kontrolnou skupinou často objavuje nulová alela génu *GSTT-1*. Tento genotyp by mohol byť považovaný za možný rizikový faktor. Jedinci homozygotní pre *GSTT-1* nulovú alelu vo všeobecnosti častejšie trpia vaskulopatiami, ktoré vedú k zvýšenému riziku rozvoja zrak ohrozujúcej DR. Naopak, nulová alela génu *GSTM-1* môže poskytovať ochranu voči rozvoju DR u diabetikov typu 2. Deficiencia v *GSTM-1* vedie k zníženej sekrécii izotiokyanátov potláčajúcich expresiu VEGF (Čilinšek, a kol., 2012), hlavného induktora angiogenézy.

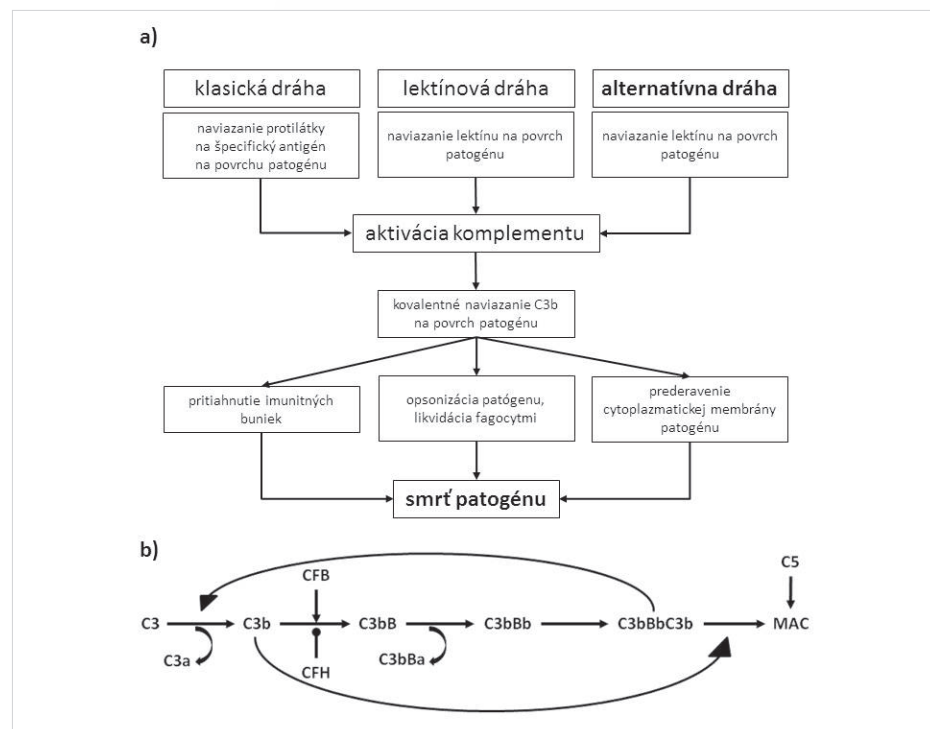


Obr. 13 Chemická reakcia glutatiónu so xenobiotikom katalyzovaná glutatión S-transferázou (GST)

Enzým **endotelová syntáza oxidu dusnatého (eNOS)** syntetizuje oxid dusnatý (NO) v bunkách endotelu kapilár. NO je hlavný endogénny vazodilatátor a má úlohu v proliferácii buniek, indukcii angiogenézy a regulácii VEGF expresie. NO inhibuje účinok vazokonstrikčných faktorov (angiotenzín II a endotelín-1) (Favero a kol., 2014). Angiotenzín II redukuje množstvo NO v plazme (Silva a kol., 2009). Oxid dusnatý má schopnosť interagovať so superoxidovým kyslíkovým radikálom ($\text{O}_2^{\cdot-}$), pričom sa tvorí vysoko reaktívny anión, peroxynitrit ($\text{ONOO}^{\cdot-}$), ktorý vyvoláva oxidačné poškodenie tkanív (Rosales a kol., 2010). Množstvo NO je významne zvýšené u pacientov s rozvinutou PDR v porovnaní s nediabetickými jedincami. V kaukazoidnej populácii pacientov s diabetom typu 2 prítomnosť 27 bp VNTR (homozygotný variabilný počet tandemových opakovaní) polymorfizmu v intróne 4 (4b/4a), konkrétne homozygotného genotypu 4a/4a v géne pre *eNOS* predstavuje 3,4 krát vyššie riziko vzniku proliferatívneho štádia DR (Čilinšek a kol., 2012). Naopak, ostatné štúdie predpokladajú, že 4a alela má voči DR protektívny efekt (Zhao a kol., 2012; Cheema a kol., 2012).

Apolipoproteín E (APOE) zodpovedá za transport lipoproteínov, v tukoch rozpustných vitamínov a cholesterolu. Gén pre APOE je multialelický, 3 rôzne alely dávajú vznik 6 izoformám proteínu. Ani jedna izoforma nie je asociovaná so vznikom DR, ale niektoré izoformy môžu mať vplyv na tvorbu tvrdých exudátov v sietnici, čo sú presakujúce lipoproteíny z poškodených kapilár na opakovane ischemizovaných miestach (Santos a kol., 2002; Liew a kol., 2006).

Komplement je systém proteínov (sérových a membránových), ktoré sa zúčastňujú zápalových procesov. Mnohé *in vitro* a *in vivo* štúdie úlohu komplementu v rozvoji diabetickej angiopatie potvrdzujú. V sklovci pacientov s DR bola pozorovaná zvýšená expresia niekoľkých faktorov komplementu, konkrétne **faktoru H (CFH)**, **faktoru B (CFB)**, komponentu 3 (C3) a komponentu 5 (C5). CFH a jeho antagonista CFB prispievajú k regulácii aktivácie komplementovej kaskády (obr. 14). Polymorfizmus rs800292 (p.I62V) v *CFH* géne ovplyvňuje väzobnú afinitu s C3b a následnú aktiváciu alternatívnej dráhy komplementu. Synergický efekt medzi polymorfizmom rs800292 v *CFH* a rs1048709 v *CFB* predstavuje významne zvýšené riziko DR (Wang a kol., 2013).



Obr. 14 a) Dráhy komplementu (upravené a prerobené podľa Iné zdroje – odkaz 5) **b) Alternatívna dráha komplementu.** C3 – komponent 3, C5 – komponent 5, CFH – komplementový faktor H, CFB - komplementový faktor B, • inhibícia, MAC – komplex atakujúci membrány (upravené a preložené podľa Zeng a kol., 2010)

Endotelín (ET-1), kódovaný *EDN-1* génom, je jedným z najúčinnejších vazokonstriktorov, má prozápalové a fibroproliferčné účinky. ET-1 prispieva k abnormálnej hemodynamike v sietnici v rámci DR, čo bolo dokázané v animálnych štúdiách použitím blokátrov ET-1 (Kalani, 2008). Polymorfizmus rs5370 *EDN-1* zvyšuje riziko DR v čínskej populácii (Li a kol., 2008; Roy a kol., 2009).

Serínová proteáza **HTRA1/ARMS2 (HtrA serínová peptidáza 1/ age-related maculopathy susceptibility 2)** je exprimovaná v rôznych ľudských tkanivách, ako sú epiderma, endotel ciev a neurálne bunky. Polymorfizmus rs11200638 génu *HTRA1* pravdepodobne súvisí s genetickou predispozíciou pre vznik makulárnej degenerácie súvisiacej s vekom (AMD). Predpokladá sa, že HTRA1 ovplyvňuje produkciu fibronektínu a stabilizuje membrány endotelových buniek. Prostredníctvom aktivácie TGF- β indukuje proces angiogenézy (Jiang a kol., 2012). Nadprodukcia HTRA1 proteínu môže mať nepriaznivý účinok na fyziologické funkcie a homeostázu endotelových buniek ciev, čo vedie k ich deštrukcii a dysfunkcii endotelu. Fibronektín je hlavnou súčasťou bazálnej membrány. U myši HTRA1 proteín degraduje fibronektín (Vierkotten a kol., 2011). Vzťah medzi polymorfizmami *HTRA1* génu a DR bol pod hraničnými hodnotami významnosti (Balasubbu a kol., 2010).

Inhibítora aktivátora plazminogénu 1 (PAI-1) sa podieľa na reparácii a remodelácii tkanív. PAI-1 má rozhodujúcu úlohu v regulácii intravaskulárnej fibrinolýzy inhibíciou konverzie plazminogénu na plazmín, ktorý štiepi fibrín v krvných zrazeninách. Štúdie sa zamerali na prepojenie **PAI-1** 4G/5G (alternatívne alely obsahujúce 4 krát G alebo 5 krát G za sebou) s rizikom rozvoja DR, ale zistenia boli štatisticky nevýznamné, pravdepodobne z dôvodu etnickej diskrepancie (Abhary a kol., 2009; Nagi a kol., 1997; Zhang a kol., 2013).

Integrín $\alpha 2 \beta 1$ (ITGA2B1) je membránový proteín trombocytov. Integrín jednak zabezpečuje príľnavosť trombocytov k stenám ciev, a zároveň slúži ako receptor pre kolagén. Trombocyty diabetickej pacientov vo zvýšenej miere reagujú s kolagénom, trombínom a adenosíndifosfátom, ktoré sa zúčastňujú na procese agregácie. Polymorfizmy v *ITGA2B1* géne ovplyvňujú hustotu integrínov na povrchu trombocytov (Kritzik a kol., 1998), čo vedie k zmenám miery agregácie. V japonskej a kaukazoidnej populácii diabetikov typu 2 je polymorfizmus restričného miesta pre *Bgl II* v *ITGA2B1* géne považovaný za rizikový faktor vzniku DR.

InterCelulárna adhezívna molekula 1 (ICAM-1) sprostredkováva proces adhézie cirkulujúcich leukocytov k stenám ciev a migráciu do intímy ciev. Zvýšená expresia *ICAM-1* v sietnici pravdepodobne zohráva kľúčovú úlohu v deštrukcii HRB prostredníctvom leukostázy, kapilárnej oklúzie a poškodenia endotelových buniek v rámci DR (Sun a kol., 2014). Polymorfizmy v géne *ICAM-1* môžu modulovať jeho vlastnú expresiu. Poznatky o polymorfizme rs5498 (p. K469E) sú nekonzistentné (Balasubbu a kol., 2010; Petrovič a kol., 2008; Sun a kol., 2014). G alela polymorfizmu rs13306430 môže pre diabetikov s DM2 predstavovať protektívny faktor voči DR (Abhary a kol., 2009).

Katepsín H (CTSH) je proteáza exprimovaná v β -bunkách pankreasu. Nadexpresia katepsínu H indukuje apoptózu buniek sekretujúcich inzulín, pravdepodobne aktiváciou kaspáz. Predpokladá sa, že má aj angiogénne vlastnosti, teda by mohol byť zapojený do zmien mikrocirkulácie počas progresie DR. Polymorfizmus rs3825932, konkrétne T alela, znižuje riziko rozvoja DR, a to pravdepodobne redukciou angiogenézy a apoptózy v sietnici (Thorsen a kol., 2015).

Matrixové metaloproteinázy (MMP) sú proteolytické enzýmy, ktoré degradujú komponenty extracelulárneho matrixu. Regulujú proliferáciu buniek, neovaskulogenézu, remodeláciu tkanív. Degradáciou proteínov v bazálnej membráne buniek je umožnená migrácia a proliferácia endotelových buniek a tvorba kapilár. Zvýšená expresia MMP-1 môže urýchľovať proces degradácie kolagénu typu IV a proteínov gap junction (typ bunkového spojenia nazývaný aj nexus), a tým urýchliť vznik vaskulárnych komplikácií diabetu. Predpokladá sa dôležitá úloha MMP-2 v rozvoji DR, pričom polymorfizmus c. C-1306T by mohol mať význam v genetickej predispozícii pre rozvoj DR (Yang a kol., 2010).

Metyléntetrahydrofolátreduktáza (MTHFR) je enzým katalyzujúci transformáciu homocysteínu na metionín prostredníctvom remetylácie. Zníženie aktivity MTHFR vedie k homocysteinémii, ktorá má cytotoxický a oxidačný účinok na endotelové bunky, rovnako zvyšuje expresiu VEGF. Najbežnejší genetický variant je zámena C za T v pozícii 677, ktorá vedie k 50 percentnému zníženiu enzymatickej aktivity (Yigit a kol., 2013). Vo viacerých populáciách bola zistená slabá súvislosť medzi týmto polymorfizmom a DR (Santos a kol., 2003; Yoshioka a kol., 2003; Roy a kol., 2009; Yigit a kol., 2013).

V sklovci pacientov s DR boli pozorované zvýšené množstvá **monocytového**

chemotaktického proteínu-1 (MCP-1). MCP-1 má schopnosť aktivácie monocytov, makrofágov a lymfocytov. Hyperglykémia zvyšuje produkciu MCP-1 v endotelových bunkách ciev sietnice, čo vedie k neovaskularizácii a zvýšenej permeabilite, k rozpadu HRB (typický jav PDR). Koncentrácia MCP-1 v sklovci diabetických pacientov koreluje s aktivitou proliferatívnej PDR (Hernández a kol., 2005). Knokautovanie (KO, vypnutie génu, z ang. *knockout*) *MCP-1* génu v diabetických myšiach viedlo k zabráneniu rozpadu HRB. V japonskej, kórejskej a čínskej populácii bol polymorfizmus rs1024611 asociovaný so vznikom DR (Katakami a kol., 2010; Jeon a kol., 2013; Dong a kol., 2014). Geneticky knokautované myši, nazývané jednoducho KO myši, sú geneticky pozmenené laboratórne myši, ktorým bol zámerne vyradený (vypnutý) gén. Táto metóda genetického inžinierstva umožňuje sledovať, akú úlohu má príslušný gén, a čo spôsobuje jeho vypnutie v organizme.

Neuropeptid Y (NPY) je sympatikový neurotransmitter, účinný angiogénny faktor odvodený z endotelu, vazokonstriktor a vaskulárny mitogén. Zámena leucínu za prolín v pozícii 7 v rámci signálneho peptidu NPY je asociovaná so vznikom DR (Niskanen a kol., 2000).

Osteoprotegerín (OPG, synonymum inhibičný faktor osteoklastogenézy (OCIF)) je dôležitá regulačná molekula vaskulatúry. Rs2073618, rs3134069 polymorfizmy majú prepojenie na DR (Ramus a kol., 2013).

Paraaxonázy 1 a 2 (PON1, PON2) sú enzýmy chrániace lipoproteíny pred oxidáciou. PON bráni oxidácii LDL (nízkodenzitný lipoproteín), pričom práve oxidácia LDL je jedným z hlavných spúšťačov ochorení mikrocirkulácie. V roku 2013 bolo analyzovaných viacero polymorfizmov u diabetických pacientov, z ktorých polymorfizmus rs854560 v *PON1* bol faktorom najviac ovplyvňujúcim vznik DR v rôznych ľudských populáciách (Wang a kol., 2013). Polymorfizmus rs854560 znižuje enzymatickú aktivitu PON1, a tým môže prispievať k zvýšenej miere oxidácie LDL.

Peroxisómovým proliferátorom aktivovaný receptor γ (PPAR γ) sa uplatňuje v metabolizme glukózy a regulácii ukladania mastných kyselín. V patogenéze DR sa uvažuje o jeho vplyve na vaskulárnu permeabilitu, zápal, angiogenézu, neovaskularizáciu a inzulínovú rezistenciu, ktoré sa všetky podieľajú na vzniku a miere závažnosti DR. Poznatky o prepojení PPAR γ polymorfizmov a DR sú nekonzistentné (Abhary a kol., 2009; Tariq a kol., 2013).

PSMD9 (proteazómová podjednotka 26S) je regulátor transkripcie inzulínového génu v Langerhansových ostrovočkoch pankreasu. Varianty v géne *PSMD9* môžu ovplyvniť transkripciu inzulínu, spôsobiť dysfunkciu β -buniek a prispieť ku vzniku diabetu typu 2. *PSMD9* je súčasťou proteazómového komplexu, ktorý degraduje intracelulárne proteíny na antigénne peptidy prezentované hlavným histokompatibilným systémom. Podieľa sa na zápalových procesoch a reguluje transkripciu cieľových génov kyseliny retinovej. V talianskej populácii boli polymorfizmy rs74421874, rs14259, rs3825172 asociované so vznikom DR (Gagnoli, 2012).

Romo-1 (modulátor reaktívnych foriem kyslíka) kóduje mitochondriálny proteín. Romo-1 zvyšuje množstvo ROS v bunkách, čím zvyšuje mieru oxidačného stresu. Polymorfizmus rs6060566 (T→C) je asociovaný so zvýšeným rizikom vzniku DR v kaukazoidnej populácii diabetikov typu 2. C alela spôsobuje zvyšovanie množstva Romo-1 vo fibrovaskulárnej membráne v porovnaní s T alelou u pacientov s PDR (Petrovič a kol., 2014).

RXRA je nukleárny receptor, ktorý sprostredkováva biologický efekt kyseliny retinovej. Vytvára komplexy, ktoré nasadajú na promótor cieľových génov a regulujú ich transkripciu. **Retinoidný X receptor alfa (RXRA)**, konkrétne inhibícia jeho funkcie, môže byť asociovaný s rozvojom DR vďaka jeho antioxidačným vlastnostiam (Chai a kol., 2008; Roy a kol., 2009). Polymorfizmus rs132300 bol spojený s progresiou DR u diabetikov druhého typu v africko-americkéj populácii. Polymorfizmus rs3818569 v **retinoidnom X receptore gama (RXRG)**, ktorý má antiproliferačný účinok, je asociovaný so zvýšeným rizikom vzniku DR v thajskej populácii (Hsieh, a kol., 2011).

SLC2A1, známy tiež ako gén pre **glukózový transportér (GLUT1)**, je exprimovaný v endotelových bunkách sietnice. Pacienti s DR majú zvýšenú expresiu **GLUT1** v endotelových bunkách. Bola preukázaná asociácia polymorfizmu c. A26177G so vznikom DR (Ng a kol., 2012).

Transformujúci rastový faktor β 1 (TGF- β 1) má dôležitú úlohu v proliferácii endotelových buniek, v angiogenéze, adhézii a tvorbe extracelulárneho matrixu. *TGF- β 1* gén môže byť zapojený do rozvoja DR a rozpadu HRB prostredníctvom indukcie angiogenézy. Polymorfizmus C. T869C (p. L10P) je asociovaný s protektívnym účinkom pri vzniku DR (Abhary a kol., 2009; Liu a kol., 2014).

Transkripčný faktor 4 (TCF4/TCF7L2) je kľúčovým komponentom tvorby ciev a sprostredkováva patologickú neovaskularizáciu počas PDR. Bežne sa vyskytujúci polymorfizmus rs7903146 *TCF7L2* je silne asociovaný s výskytom diabetu typu 2 a PDR v kaukazoidnej populácii (Luo a kol., 2013). Talianska štúdia zistila prepojenie viacerých *TCF7L2* variant (rs7903146, rs7901695 and rs12255372) nielen v súvislosti s DR, ale aj s kardiovaskulárnymi ochoreniami a koronárnou chorobou srdca (Ciccacci a kol., 2013).

Zápalové procesy zohrávajúce významnú úlohu v indukcii diabetických komplikácií, medzi ktoré patrí aj diabetická retinopatia, sú často vyvolané neadekvátnou aktiváciou niektorej zo súčastí imunitného systému. **TLR4 (toll-like receptor 4)** aktivuje prozápalové odpovede cez ligand závislú aktiváciu signálnej dráhy nukleárneho faktoru κ B (NF- κ B). Každá deregulácia signalizácie TLR4 vplyvom SNP v jeho extracelulárnej doméne môže ovplyvniť väzobnú aktivitu pre ligand, a tým narušiť rovnováhu produkcie pro- a anti-zápalových cytokínov (Buraczynska a kol., 2009). Polymorfizmy rs4986790, rs4986791, rs10759931 a rs1927914 v *TLR4* znižujú riziko DR (Buraczynska a kol., 2009; Singh a kol., 2014; Xu a kol., 2015).

UCP 1 (uncoupling protein 1) je mitochondriálny membránový prenášač elektrónov zohrávajúci dôležitú úlohu v ochrane pred oxidačným stresom. Predpokladá sa, že **UCP-1** hrá úlohu v inzulínovej rezistencii, keď dôjde k aktivácii dráh indukovaných oxidačným stresom. SNP rs1800592, ktorý je lokalizovaný v promótere génu, bol u ľudí asociovaný s narušenou glukózovou homeostázou, obezitou, a taktiež so zmenami indexu telesnej hmotnosti (BMI), čo vyúsťuje do metabolických ochorení (Mutombo a kol., 2013). *UCP-1* bol navrhnutý ako kandidátny rizikový marker pre vznik DR a polymorfizmus rs1800592 (c. A-3826G) je asociovaný so vznikom PDR (Brondani a kol., 2012; Zhang a kol., 2014). **UCP 2 (uncoupling protein 2)** reguluje produkciu ROS v mitochondriách. Nadprodukcia ROS sa spája s DR, takže gén **UCP-2** a jeho polymorfizmy môžu byť zapojené do rozvoja diabetických komplikácií, vplyvom nerovnováhy v produkcii ROS. Polymorfizmus rs660339 sa dá považovať za relevantný rizikový faktor pre PDR pri diabete typu 1 aj 2 (Crispim 2010; Roy a kol., 2009).

Vitamín D má antiproliferačné a antiangiogénne vlastnosti, moduluje apoptózu a ovplyvňuje metabolizmus vápnika. Svoje fyziologické vlastnosti uskutočňuje naviazaním sa na svoj receptor - **receptor pre vitamín D (VDR)**. *VDR* je exprimovaný v rôznych tkanivách

ľudského organizmu, vrátane retiny. V kórejskej populácii polymorfizmus rs1544410 znižuje riziko vzniku DR, čo sa ale v poľskej populácii nepotvrdilo (Cyganek a kol., 2006; Hong a kol., 2015). Polymorfizmy rs10735810 a rs2228570 zvyšujú riziko vzniku DR (Abhary a kol., 2009; Zhong a kol., 2015).

V tejto kapitole sa poukázalo na najdôležitejšie kandidátne gény a ich polymorfizmy, ktoré boli najčastejšie asociované s diabetickou retinopatiou v rôznych ľudských populáciách v mnohých nezávislých štúdiách. Zároveň sa stručne priblížili možné úlohy jednotlivých génov v jej patogenéze. Zvyšné gény, ktorých úloha v rozvoji DR nie je doposiaľ úplne ozrejmeneá, sú zhrnuté v tabuľke 1 v abecednom poradí. Vynechali sa však štúdie a gény, ktoré popisovali polymorfizmy s veľmi nízkymi alebo hraničnými hodnotami, mali malé štatistické súbory, alebo neboli v rámci iných štúdií a populáciách vôbec zachytené. Takisto sa vynechali štúdie, ktoré boli realizované len na jednej populácii a polymorfizmy nevykazovali žiaden vzťah so vznikom retinopatie.

Napriek rozsiahlym snahám identifikovať nové genetické markery prostredníctvom štúdií kandidátnych génov sa doteraz nepodarilo identifikovať ani jeden polymorfizmus, ktorý by bolo možné všeobecne prijať za vysokorizikový faktor DR. Neúspech môže byť spôsobený komplexnosťou tejto mikrovaskulárnej komplikácie diabetu, ktorej patofyziológia je multifaktoriálna a vplývajú na ňu nielen polygénové, ale aj environmentálne faktory, ktoré sa nedajú indetifikovať (Liew, 2009).

Polymorfizmy v niektorých génoch vykazujú rôznu mieru vplyvu na vznik DR a rôznu štatistickú významnosť, čo môže byť vysvetlené genetickými rozdielmi medzi jednotlivými etnikami.

Ďalším pravdepodobným dôvodom neúspechu môže byť zameranie sa na jednotlivé SNP, kde sa väzbová nerovnováha nemusí prejavovať (Ng, 2010). V rámci štúdií by bolo zaujímavé sledovať haplotypy asociované s DR, a nie jednotlivé SNP. Nedostatočné množstvo vzoriek na zachytenie polymorfizmov s miernym účinkom v jednotlivých štúdiách, neúplné pokrytie genetickej variability v kandidátnych génoch a nesprávne hypotézy o úlohe génov v patofyziológii DR môžu byť zodpovedné za kontroverzné výsledky štúdií kandidátnych génov.

Na základe spomenutých nedostatkov štandardného prístupu ku kandidátnym génom, dve nedávne nezávislé štúdie zvolili mierne odlišný prístup. Analyzovali naraz vyšší počet kandidátnych génov na výrazne väčšom štatistickom súbore prístupom, ktorý napodobnil celogenómovú analýzu (Roy a kol., 2009; Sobrin a kol., 2011). Sobrin a kol. v štúdií CARE (*Candidate gene Association Resource*) analyzovali 2691 pacientov s diabetom 2. typu a sledovali polymorfizmy v 2000 génoch. Napriek tomu nepotvrdili žiaden štatisticky významný vzťah medzi popísanými génmi a vznikom DR (Sobrin a kol., 2011). Najzaujímavejšie zistenie sa týkalo variantov v génoch pre **P-selektín (SELP)** (rs6128) a **iduronidázu** (rs6856425), ktoré boli preukázateľne u Američanov s európskym pôvodom významne asociované s DR, pričom u Američanov s africkým, hispánskym a ázijským pôvodom tento vzťah významný nebol. Roy a kol. sledovali 437 pacientov africko-americkéj populácie s diabetom typu 1 a retinopatiou a zamerali sa na 193 kandidátnych génov (1536 polymorfizmov). Našli 13 génov asociovaných s progresiou DR. Polymorfizmy sú zhrnuté v tabuľke 2 a 3 (Roy a kol., 2009). Identifikované gény sú zapojené do viacerých signálnych dráh súvisiacich s metabolizmom glukózy, zápalovými procesmi, angiogenezou, vaskulárnou permeabilitou, inzulínovou signalizáciou, vývojom sietnice a reguláciou krvného tlaku. Možné úlohy vybraných kandidátnych génov významných **pri vzniku DR**, ktoré sa podarilo identifikovať Royovi a jeho spolupracovníkom, sú zosumarizované v tabuľke a opísané v nasledujúcom texte (tabuľka 2).

Angiopoietín 1 (ANG-1, ANGPT1) je vaskulárny rastový faktor, ktorý indukuje angiogenezu. ANG-1 podporuje prežívanie endotelových buniek bez indukcie ich proliferácie, bráni presakovaniu z kapilár a stabilizuje interakcie endotelu s okolitými bunkami (Thurston a kol., 2000). ANG-1 potláča expresiu *VEGF* a *ICAM-1* v sietnici postihnutej diabetom, a zároveň má protizápalové vlastnosti. ANG-1 takisto inhibuje rozpad HRB, chráni endotel ciev sietnice pred poškodením leukocyty (Joussen a kol., 2002). Tieto poznatky naznačujú možnosť využitia ANG-1 ako terapeutického agensu na prevenciu a liečbu DR.

Funkcia proteínu **BBS2 (Bardet-Biedl syndróm 2 proteín)** nie je doposiaľ objasnená. Abnormality BBS2 proteínu vyvolávali u myši degeneráciu sietnice a zvýšenú mieru incidencie DM a hypertenzie (Nishimura a kol., 2004).

V retine sa nachádzajú **dopamínové receptory D1 a D2 (DRD)**, ktoré po aktivácii neurotransmitterom, dopamínom, majú vplyv na viaceré fyziologické a modulačné funkcie

pri prenose signálu. Dopamín, ako hlavný katecholamín v sietnici, sa prostredníctvom DRD podieľa na regulácii krvného tlaku zmenou priemeru ciev sietnice a krvného prietoku (Beige a kol., 2004).

ENPP1 (ektonukleotidová pyrofosfatáza/fosfodiesteráza 1) je transmembránový glykoproteín, ktorý štiepi široké spektrum substrátov. ENPP1 inhibuje inzulínovú signalizáciu interakciou s inzulínovým receptorom. Expresia **ENPP1** vedie k inzulínovej rezistencii. ENPP1 je väzobným partnerom integrínov zapojených do bunkovej adhézie, bunkovej komunikácie a angiogenézy (Leitão a kol., 2008).

FLT1/VEGFR1 (FMS-podobná tyrozín kináza 1/receptor pre vaskulárny endotelový rastový faktor) je gén pre tyrozínkinázový receptor exprimovaný na povrchu endotelových buniek ciev sietnice a jeho produkt sprostredkováva biologický účinok VEGF (Kim a kol., 1999). FLT1 má úlohu nielen v angiogenéze a modulácii vaskulárnej permeability, ale aj v zápale (Roy a kol., 2009).

Hlavný histokompatibilný komplex, trieda I, B (HLA-B) je proteín zapojený do imunitných procesov v organizme (Roy a kol., 2009).

Serotonínový receptor 1B (HTR1B) je exprimovaný v gangliových bunkách retiny. Serotonín pôsobí ako neurotransmiter, je produktom aktivovaných trombocytov a indukuje vazodilatáciu prostredníctvom produkcie NO, čím môže ovplyvňovať krvný prietok v sietnici (Roy a kol., 2009).

ROBO2 (roundabout, axon guidance receptor, homológ 2) je receptor lokalizovaný v bunkách sietnice. Podieľa sa na navigovaní axónov, migrácii a adhézii buniek a chemotaxii. Každá z týchto úloh môže prispieť k rozvoju DR, ale toto prepojenie ešte nebolo dokázané (Roy a kol., 2009).

SLC2A1/GLUT1 (solute carrier family 2, member 1) je glukózový transportér v endotelových bunkách sietnice. Nadexpresia GLUT1 a zvýšený transport glukózy sú vyvolané hypoxiou, pôsobením rastových faktorov a cytokínov. Hyperglykémia sa ukazuje byť jedným z najvýznamnejších induktorov progresie DR (Takagi a kol., 1998).

Roy a kol. ďalej identifikovali aj možné úlohy kandidátnych génov **v progresii DR**.

Sú opísané v nasledujúcej časti (tabuľka 3).

Kataláza (CAT) je antioxidačný enzým katalyzujúci premenu peroxidu vodíka na vodu. CAT napomáha zvládnutiu oxidačného stresu (Roy a kol., 2009).

Inzulínový receptor (INSR) je exprimovaný v cievach aj neurónoch v sietnici, ale jeho funkcia nie je úplne definovaná. Zmeny signalizácie INSR môžu ovplyvňovať procesy prebiehajúce v sietnici, pretože aktivácia receptora vedie k antiapoptickým procesom. Retina je však tkanivo citlivé na inzulín a poruchy na úrovni INSR spôsobujú dysfunkciu a smrť buniek sietnice (Reiter, Gardner, 2003). DM vedie k zníženej miere signalizácie INSR v sietnici (Jiang a kol., 2013).

Výsledky prezentované Royom a kol. a Sobrinom a kol. nepriňajú spoločné závery. Roy a kol. poukázal na 13 génov s možným významom v diabetickej retinopatii (tabuľka 2 a 3), Sobrin a kol. na dva gény, pričom nedochádza k žiadnemu prekryvu genetických asociácií medzi týmito dvoma štúdiami. Je pravda, že Roy a kol. sledovali diabetikov s typom 1 a Sobrin a kol. naproti tomu diabetikov s DM2. Pri predpoklade, že DR má čiastočne genetický základ, očakávali by sa podobnejšie výsledky genetických analýz, teda identifikácia rovnakých polymorfizmov/génov asociovaných s DR.

Ďalší úspech sledovania kandidátnych génov závisí pravdepodobne na lepšej charakterizácii a definovaní klinických fenotypov DR s ohľadom na etnickú príslušnosť, ktoré sa líšia progresiou a závažnosťou DR. Len v takom prípade bude možné priniesť štatisticky významné výsledky aplikovateľné do diagnostickej praxe. Zaujímavé by bolo analyzovať mutácie v génoch podieľajúcich sa na iniciovaní hyperglykémie (Gašperíková a kol., 2009), pretože sa dá predpokladať, že práve tieto gény nepriamo prispievajú k rozvoju diabetu a retinopatie.

4.2. VÄZBOVÉ ŠTÚDIE

Cieľom väzbových štúdií je identifikovať genómové regióny, ktoré môžu byť potenciálne asociované s chorobami, v tomto prípade s diabeticou retinopatiou. Štúdie kandidátnych génov, ktoré boli spomenuté v predchádzajúcej časti, vychádzajú z prvej

hypotézy o možnej úlohe daného génu a jeho produktu v sledovanom ochorení. Analýza vo väzbových štúdiách je založená na predpoklade, že **genetický marker** bude **segregovať** (rozchod chromozómov do dcérskych buniek počas delenia) spoločne s lokusmi zodpovednými za predispozíciu k vzniku diabetickej retinopatie v rámci rodiny. Genetický marker je známa sekvencia DNA, ktorá je v populácii variabilná. Markerom môžu byť bodové substitúcie, ale aj dlhšie úseky DNA, podmienkou je však ich ľahká identifikovateľnosť pomocou molekulárno-genetických metód.

Na základe výsledkov väzbových štúdií, tri regióny lokalizované na chromozómoch 1, 3 a 12 môžu byť asociované so vznikom DR. Regióny boli identifikované vo vybraných vzorkách pacientov populácie Pima Indiánov a mexických Američanoch. Pima Indiáni sú často objektom genetických štúdií, pretože tvoria vysoko homogénnu populáciu s celosvetovo najvyššou incidenciou diabetu. Pre pôvodné obyvateľstvo Ameriky je typická vysoká incidencia diabetu spolu s inými ochoreniami, ako sú koronárne ochorenie srdca, mozgová príhoda a hypertenzia. Vysvetľuje sa to tzv. „*thrifty*“ fenotypom, ktorý je asociovaný s rastovou retardáciou plodu pri obmedzených nutričných podmienkach a so spomínanými chronickými ochoreniami pribúdajúcimi v dospelosti (Hales, Baker, 1992).

Na štatistické overenie výsledkov získaných pomocou väzbových analýz sa používa tzv. *LOD skóre (logarithm (base10) of odds)*. Porovnáva pravdepodobnosť, či dva konkrétne lokusy sú skutočne vo väzbe, a či sa nejedná o náhodný jav. Pozitívne LOD skóre napovedá o väzbe medzi lokusmi, pričom negatívne naopak hovorí v prospech náhodného javu. LOD skóre spomínaných regiónov na chromozómoch 1, 3 a 12, okrem 1p36 (chromozóm 1, malé ramienko, prúžok 36), bolo relatívne nízke a nebolo štatisticky významné pre celogenómové štúdium (Looker a kol., 2007). V dvoch vzájomne nesúvisiacich štúdiách na populáciách Pima Indiánov a mexických Američanov dosahoval vyššie hodnoty LOD skóre jedine úsek 1p36. V prípade Pima Indiánov vyšlo LOD skóre 2,58 a v prípade mexických Američanov 1,24 (Looker a kol., 2007; Fu a kol., 2010).

Zvyšné génové oblasti, ktoré boli tiež identifikované väzbovými štúdiami, sú zhrnuté v tabuľke 4. Väzbové štúdium nepotvrdilo vzťah genómových regiónov s predtým identifikovanými kandidátnymi génmi a vznikom diabetickej retinopatie. Väzbové štúdium sú vhodnejšie na výskum monogénových ochorení alebo ochorení s typickou Mendelistickou dedičnosťou, a práve v prípade DR sa preto nedajú očakávať štatisticky významné výsledky.

4.3. GENETICKÉ ASOCIAČNÉ ŠTÚDIE

Celogenómové asociačné štúdie, tzv. **GWAS** (*genome-wide association study*), predstavujú nový prístup identifikácie kandidátnych génov. Ide o robustné vyhodnotenie jednonukleotidových polymorfizmov (SNP), v súbore vysokého počtu vzoriek a charakterizáciu väzbovej nerovnováhy (dve alely, ktoré sú v genetickej väzbe, sa vyskytujú súčasne na jednom chromozóme oveľa častejšie, ako by sa dalo očakávať na základe náhody) (Simó-Servat a kol., 2013). Tisíce SNP sú simultánne testované s cieľom odhaliť vzťah k diabetickej retinopatii. Napriek tomuto masívnemu postupu sa pomocou GWAS nepodarilo identifikovať SNP, ktorý by u diabetickej retinopatie dosiahol štatistickú významnosť na celogenómovej úrovni (Grassi a kol., 2011).

Do dnešnej doby bolo na diabetickej pacientoch realizovaných 5 hlavných GWAS štúdií (Fu a kol., 2010; Huang a kol., 2011; Grassi a kol., 2011; Grassi a kol., 2012; Sheu a kol., 2013; Awata a kol., 2014). Na osobách bez diabetu bola realizovaná len jediná štúdia (Jensen a kol., 2013) (zhrnuté v tab. 5). Ani jedna zo štúdií však neidentifikovala konzistentný a vierohodný rizikový lokus, teda konkrétny SNP. V štúdiu realizovanej kolektívom autorov pod vedením Grassiho bol identifikovaný polymorfizmus rs476141 lokalizovaný medzi génmi *AKT3* a *ZNG238*, rs4865047 v *CEP125*, rs1902491 *upstream* od *NPY2R*, ktorý vykazoval najvyššiu mieru asociácie s DR (Grassi a kol., 2011). Jensen identifikoval polymorfizmus rs12155400 v *HDAC9* géne, ktorý by mohol byť asociovaný s miernou formou DR vyskytujúcou sa nezávisle od diabetu. Toto zistenie však bolo pravdepodobne zaťažené štatistickou chybou a vyšlo falošne pozitívne. V rámci piatich prevedených štúdií GWAS sa žiadny z identifikovaných genetických variantov neprekrýval. Tieto genetické nezrovnalosti môžu vyplývať zo značnej heterogenity konceptu jednotlivých štúdií, v definovaní skupiny s retinopatiou a kontrolnej skupiny, prípadne malého počtu vzoriek (Kwak, Park, 2015).

GWAS má svoje limitácie. V prípade identifikácie bežne sa vyskytujúceho genetického variantu je potrebný veľký počet vzoriek, aby sa stanovila hranica, kde polymorfizmus nadobúda štatisticky významnú hodnotu vzhľadom na dané ochorenie. Aplikovaním meta-analýz je možné vyhnúť sa potrebe vysokého počtu vzoriek v rámci jednej štúdie. Meta-analýza je kvantitatívny prístup zhrnutia výsledkov viacerých štúdií s rovnakou tematikou, s cieľom zvýšiť štatistickú silu analýzy a priniesť štatisticky významné výsledky. Takýto prístup má taktiež svoje výhody a nevýhody, ako napríklad vyššie riziko genetickej a fenoty-

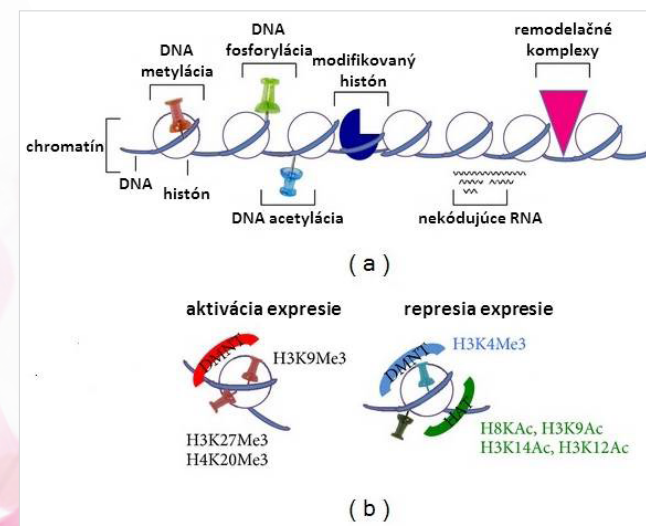
pickej heterogenity, ktorá môže výsledky skresľovať (Doria, 2010). Riziko rozvoja DR sa líši u jednotlivých etnických skupín, z čoho vyplýva, že aj tento parameter musí byť zohľadnený v realizovaných analýzach a výsledky sa musia vyhodnocovať v kontexte s ním. Hlavnými problémami GWAS štúdií pri analyzovaní DR je výskyt znakov, ktoré sú prítomné aj u pacientov bez diabetu, napríklad mikrovaskulárne lézie, a ďalej nekonzistentne definované kontrolné skupiny v štúdiách, ktoré väčšinou zohľadňujú len trvanie diabetu, bez ohľadu na ďalšie rizikové faktory.

V roku 2015, Hosseini a kol. vykonali robustnú meta-analýzu hlavných GWAS štúdií zaoberajúcich sa vznikom DR, pri čom do nej zahrnuli aj štúdiu kandidátnych génov (Abhary a kol., 2009). V Hosseiniho štúdiu polymorfizmy rs1571942 a rs12219125 v PLXDC2 preukazovali silnú väzbovú nerovnováhu a asociáciu so závažnou formou DR. Po viacnásobnom testovaní autori nepotvrdili žiaden vzťah medzi predtým identifikovanými 34 najvýznamnejšími variantmi prezentovanými v predchádzajúcich štúdiách a naznačili, že všetky tieto štúdie môžu byť falošne pozitívne. Nekonzistentnosť výsledkov genetických štúdií zaoberajúcich sa DR a neschopnosť získať užitočné, štatisticky významné výsledky sú spôsobené nezohľadnením významných rizikových faktorov, akými sú trvanie diabetu a dlhodobá kontrola glykémie, či nepresným popisovaním skupín vzoriek (s retinopatiou a kontrolných) a neprihliadaním na fenotypové odlišnosti jednotlivých prípadov.

5. EPIGENETICKÉ MECHANIZMY ZAPOJENÉ DO DIABETICKEJ RETINOPATIE

Epigenetické mechanizmy ovplyvňujú expresiu génov a ich funkciu bez zmeny sekvencie DNA a môžu byť reverzibilné, dedičné i ovplyvnené prostredím. K epigenetickým mechanizmom patrí DNA metylácia, posttranslačná modifikácia histónov, remodelácia chromatinu a nekódujúce RNA (Mazzio, Soliman, 2012) (obr. 15a). Epigenetické zmeny sa podieľajú na patologických odpovediach organizmu, ako je zápal a neurodegenerácia, obe prispievajúce k rozvoju diabetickej retinopatie (Perrone, 2014).

Štruktúra chromatinu značne ovplyvňuje génovú expresiu. Pri zvýšenej hustote chromatinu je transkripcia utlmená (heterochromatín - vysoko kondenzovaný), zatiaľ čo transkripčne aktívne oblasti sú asociované s voľnejšou chromatinovou štruktúrou (euchromatín - menej kondenzovaný stav chromatinu) (Mazzio, Soliman, 2012).



Obr. 15 Epigenetické mechanizmy regulovania expresie. a) Modifikácie chromatinovej štruktúry b) Vplyv modifikácie histónov na génovú expresiu. DNMT – DNA-metyltransferázy, HAT – histónacetyltransferázy (upravené a preložené podľa Perrone a kol., 2014)

Hyperglykémia je hlavný patologický faktor vyvolávajúci diabetické komplikácie. Aj keď môže byť kontrolovaná pomocou liekov, úpravou stravovacích návykov a cvičením, veľa pacientov stále trpí závažnými komplikáciami diabetu. Dodržiavanie prísnej glykemickej kontroly v skorých štádiách ochorenia môže viesť k inhibícii rozvoja DR a upraveniu zdravotného stavu, a len zriedkavo dochádza k strate zraku (Fong a kol., 1999). Avšak účinok striktnej kontroly glykémie vzhľadom na priebeh DR nie je okamžitý a začne sa prejavovať až po niekoľkých rokoch. Dokonca, ak pacient predtým kontroly hladiny glukózy v krvi dlhodobo zanedbával, nedochádza k spomaleniu progresie DR (Perrone a kol., 2014). A naopak, pozitívne účinky dodržiavania prísnej glykemickej kontroly pretrvávajú aj po konci tejto kontrolovanej periódy (Zeng, Chen, 2014), čo môže byť spôsobené „spomienkou“, na predchádzajúce vystavenie buniek vysokým koncentráciám glukózy. Výsledkom je pretrvávajúce škodlivé efekty dlho po začatí striktnej kontroly glykémie. Tento pamäťový fenomén bol pozorovaný nielen v experimentálnych modeloch, ale aj v klinických štúdiách DCCT a EDIC (*Diabetes Control and Complications Trial, Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*) (Reddy a kol., 2015). Tieto zistenia viedli k hypotéze existencie tzv. **metabolickej pamäti organizmu**, ktorá je ovplyvnená predchádzajúcimi dejmi, a práve epigenetika v nej môže zohrávať kľúčovú úlohu.

Zmeny štruktúry chromatinu sú ovplyvnené predovšetkým **DNA metyláciou**. Enzyмы nazývané **DNA metyltransferázy (DNMT)** pridávajú metylovú skupinu na piaty uhlík cytozínu (5-mC), pričom CpG (cytozín - ľubovoľná báza - guanín) ostrovcy sú najčastejším cieľom metyltransferáz. Metylácia sa uskutočňuje najmä v regulačnej oblasti génu nazývanej promótor, ale môže nastať aj v iných oblastiach v genóme. Vo všeobecnosti CpG metylácia vypína gény vďaka zhutneniu štruktúry chromatinu, zatiaľ čo demetylácia zvyšuje transkripčnú aktivitu, čiže zapína gény. Efekt metylácie však závisí aj od genómového kontextu (Jones, 2012). Väčšinou metylácia promótorového regiónu reprimuje génovú expresiu a metylácia v rámci génu reguluje napr. elongáciu transkripcie (tvorbu mRNA) a alternatívny splicing (variabilné vystrihovanie intrónov - nekódujúcich oblastí génu). Metylovaná DNA je rozpoznávaná metyl-väzobnými proteínmi, ktoré interagujú s transkripčnými korepresormi a ďalšími proteínmi meniacimi génovú expresiu (Jones, 2012). S-adenozyl metionín (SAM) je donor metylovej skupiny. Je zaujímavé, že u pacientov s DR je znížené množstvo SAM, čo by mohlo naznačovať, že alternácie DNA zohrávajú úlohu v rozvoji tohto ochorenia (van Hecke a kol., 2008). DNA metylácia môže mať úlohu v metabolickej pamäti. K poškodeniu mitochondriálnej DNA (mtDNA) prispieva metylácia CpG v regulačnom regióne katalytic-

kej podjednotky DNA polymerázy γ (POLG1), ktorá vedie k zníženiu jej exprese (Tewari, Kowluru, 2012). Pre konkrétne závery sú však potrebné podrobnejšie štúdie o úlohe DNA metylácie v patofyziológii DR.

Históny sú posttranskripčne modifikované acetyláciou, metyláciou, fosforyláciou, ubiquitinyáciou a sumoyláciou. Väčšinou je modifikovaný N-koniec histónov. Vo všeobecnosti acetylácia, hlavne H3 a H4 lyzínových zvyškov, teda zvyškov na históne 3 a 4, koreluje s transkripčnou aktivitou, kým deacetylácia a metylácia inhibujú génovú expresiu (obr. 15b). Hlavné **histónacetyltransferázy (HAT)** sú p300/CBP a pCAF, zatiaľ čo **históndeacetylázy** sú HDAC a sirtuíny (Cosentino, Mostoslavsky, 2013). HAT využívajú ako substrát acetylkoenzým A (acetyl-CoA), ktorý vzniká metabolizmom glukózy. Z toho vyplýva, že chronická hyperglykémia bude vplyvať na dostupnosť acetyl-CoA, a teda aj na mieru tejto histónovej modifikácie. Konkrétne miesta acetylácie na histónových chvostoch asociované s transkripčne aktívnymi promótormi sú lyzín 9 na históne 3 (H3K9Ac), lyzín 14 na históne 3 (H3K14Ac), lyzín 8 na históne 4 (H4K8Ac), lyzín 12 na históne 4 (H4K12Ac). Dimetylácia a trimetylácia lyzínu 4 na históne 3 (H3K4Me3) tiež aktivujú transkripciu. Naopak metylácie histónov H3K9Me3, H3K27Me3 a H4K20Me3 sú asociované s inhibíciou transkripcie (obr. 15b) (Wong a kol., 2011).

Zmeny exprese históndeacetyláz môžu prispievať k progresii DR. V animálnych modeloch sa na vyvolanie príznakov diabetu používa streptozotocín. Laboratórnym potkanom bola zámerne nevhodne kontrolovaná glykémia a zároveň im bol podávaný streptozotocín po dobu 6 mesiacov. Došlo k zvýšenej expresii *HDAC1*, *HDAC2* a *HDAC8* a zníženiu aktivity histónacetyltransferázy. Aj po nastolení striktnej glykemickej kontroly ostala expresia génov rovnaká (Zhong, Kowluru, 2010). Tieto pozorovania naznačujú, že zmeny modifikácie histónov môžu byť príčinou progresie DR aj v prípade navrátenia sa k dobrej glykemickej kontrole.

Jedným z mnohých kandidátnych génov s úlohou v epigenetickej pamäti u pacientov s diabetickou retinopatiou je **SOD2 (MnSOD)** spomínaný aj v predchádzajúcej kapitole. SOD2 chráni mtDNA pred oxidačným poškodením indukovaným hyperglykémiou (Madsen-Bouterse a kol., 2010). Expresia tohto génu u hlodavcov vedie k zabráneniu rozvoja DR. Hyperglykemický atak indukuje zvýšenú acetyláciu H3K9, H4K20me3 v promótore a v enhancere (zosilovač transkripcie) *SOD2*, čo vedie k zníženiu exprese. Hyperglykémiou

sa taktiež aktivuje expresia génu *SUV420h2* kódujúceho enzým, ktorý sprostredkováva metyláciu proteínu SOD2. Expresia *SOD2* je regulovaná aj pomocou LSD-1 (lyzín špecifická demetyláza 1). Hyperglykémia indukuje demetyláciu H3K4, čo zvyšuje mieru naviazovania LSD-1 a Sp1 na *SOD2*. Dochádza k jeho transkripčnej represii. *Silencing* LSD-1 bráni epigenetickým zmenám SOD2 vyvolaným hyperglykémiou (Zhong, Kowluru, 2013). *Silencing* je spôsob regulácie génovej expresie, konkrétne jej potlačenie na úrovni transkripcie alebo translácie (prekladu genetickej informácie z mRNA do proteínov). V ľudských sietniciach pacientov trpiacich DR je znížené množstvo H3K4 a zvýšené množstvo LSD-1 (Forneris a kol., 2008), čo je v súlade s výsledkami štúdií vyhodnotených na animálnych modelových organizmoch. Ďalšie proteíny, vykazujúce zmeny metylácie počas DR, sú metaloproteináza 9 (MMP-9), p65, tioredoxín-interagujúci proteín (TXNIP).

Epigenetické modifikácie zvyšujú expresiu MMP-9, čo prispieva k zvýšenej miere poškodzovania mtDNA, obzvlášť počas postupujúcej DR (Zhong, Kowluru, 2013).

Hyperglykémia vyvoláva epigenetické zmeny aj v promótoch **cyklooxygenázy 2 (COX-2)** v endotelových bunkách sietnice už v skorých štádiách DR. TXNIP je induktorom neovaskularizácie a endotelovej dysfunkcie. Hyperglykémia zosilňuje expresiu TXNIP, ktorý následne vyvolá epigenetické zmeny v promótoch *cyklooxygenázy 2 (COX-2)*. Zároveň hyperglykémia vedie k naviazaniu transkripčného kofaktora p300 na promótor TXNIP v sietnici diabetických potkanov, čo zvyšuje jeho expresiu. *Silencing* TXNIP úplne ruší epigenetické zmeny v *COX2* promótoch a blokuje progresiu DR, dokonca aj počas hyperglykémie (Perrone a kol., 2010). Z týchto záverov vyplýva, že TXNIP by mohol zohrávať úlohu v udržiavaní metabolickej pamäti.

Zdá sa, že oxidačný stres vyvolaný hyperglykémiou aktivuje viaceré dráhy, a tak sa podieľa na metabolickej pamäti. Produkcia reaktívnych foriem kyslíka v endotelových bunkách indukuje epigenetické zmeny v promótoch génu pre p65, čo je podjednotka NF-κB. Konkrétne metyluje H3K4 a demetyluje H3K9. Táto alternácia vedie k zvýšenej expresii p65, a tým aj k expresii prozápalových génov regulovaných p65 (El-Osta a kol., 2008; Bracchio a kol., 2009). Na metabolickej pamäti sa môže podieľať aj produkcia a akumulácia AGEs a možná chronická aktivácia RAGE, ktoré vyvolávajú dlhodobé vaskulárne poškodenie (Perrone a kol., 2014).

K **nekódujúcim RNA (ncRNA)** patria krátke interferujúce RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA), Piwi-interagujúce RNA (piRNA), dlhé nekódujúce RNA (lncRNA), dlhé nekódujúce intergénové RNA (lincRNA) a cirkulujúce RNA (circRNA) (Perrone a kol., 2014). Spomedzi všetkých ncRNA sú najviac študované mikroRNA. Práve miRNA môžu ovplyvňovať expresiu viacerými spôsobmi. Buď priamo naviazaním sa na DNA v oblasti promótoru, prípadne naviazaním sa na 3' neprekladaný región na konci mRNA cieľového génu (to vedie k vypnutiu translácie alebo k degradácii mRNA). Prípadne interakciou s transkripčnými faktormi a RNA viažúcimi proteínmi, čo môže ovplyvniť expresiu génu a vytváranie iných typov RNA (RNA processing) (Lee, Shin, 2012; Kato a kol., 2013).

Experimenty snažiac sa odhaliť pozadie DR u myší, ktorým bol podávaný už spomínaný streptozotocín, sa zameriavajú na zmeny expresie miRNA. Wu a kol. v 2012 detegovali zmeny expresie 37 miRNA v patogenéze DR. Regulačné miRNA pre **NF-κB** (miRNA-146, miRNA-155, miRNA-132, miRNA-21), pre **VEGF** (miRNA-17-5p, miRNA-18a, miRNA-20a, miRNA-21, miRNA-31, miRNA-133, miRNA-200b) a **p53** (miRNA-34) boli nadexprimované v sietniciach potkanov, ktorým bol podávaný streptozotocín. NF-κB zohráva významnú úlohu v patogenéze retinopatie, pretože je kľúčovým regulátorom odpovede imunitného systému a spúšťa proapoptotickú kaskádu v retinálnych pericytoch. Takisto boli u diabetických myší pozorované zvýšené množstvá miRNA, ktoré sú regulované NF-κB (Kovacs a kol., 2011). Proteín P53 (produkt tumor supresorového génu *TP53*, nazývaný aj strážca genómu) spúšťa proapoptotické deje v bunkách zastavením bunkového cyklu a VEGF indukuje angiogézu a endotelovú permeabilitu. Ďalšia štúdia opisuje znížené množstvo miRNA-146 v sietnici diabetických potkanov (Feng a kol., 2011). Cieľovým génom miRNA-146a je fibronektín, čo môže vysvetľovať zvýšenú produkciu proteínov extracelulárneho matrixu počas diabetu.

Kedže jedným zo spúšťačov DR je **bunkový stres** (vrátane oxidačného, mitochondriálneho a stresu endoplazmatického retikula (ER)), regulačné miRNA s cieľovými génmi, ktorých produkty zohrávajú úlohu v odpovedi na bunkový stres, môžu vplývať na rozvoj DR. Relevantné gény, ktoré nie sú priamo exprimované v sietnici, ale ich dysregulácia vyvoláva zvýšenú produkciu ROS v organizme, sú **hémoxygenáza-1 (HO-1)**, **superoxid-dismutáza (SOD 1/2)** a **NADPH oxidáza 4 (NOX4)** (Kato a kol., 2013).

Objavenie zapojenia miRNA do patofyziológie DR otvára nové možnosti pre výskum a hlavne generovanie účinných terapeutík, napr. podávaním intravitreálnych injekcií špecifických miRNA inaktivujúcich konkrétne gény vyvolávajúce DR (Zeng, Chen, 2014). Vďaka zlepšeniu techník na zachytenie miRNA, môžu byť miRNA využité aj ako biomarker v diagnostike. Objavujú sa nové štúdie o možnej úlohe dlhých nekódujúcich RNA v rozvoji DR (Jaé, Dimmeler, 2015). Medzi hlavné molekulo-biologické techniky patrí kvantitatívna PCR (polymerázová reťazová reakcia), DNA-mikročipy a sekvenovanie novej generácie.

Nevýhodou epigenetických zmien, vrátane DNA metylácie, modifikácie histónov a expresie nekódujúcich RNA, je ich obrovská variabilita, a teda potreba rozsiahleho výskumu, ktorým by sa podarilo odhaliť kľúčové epigenetické zmeny vedúce k DR (Kato a kol., 2013). Progresia DR je často asociovaná so zvýšenou acetyláciou histónov, čo vedie k zmene génového expresného profilu. **Garcinol**, inhibitor HAT, blokuje epigenetické modifikácie a taktiež progresiu DR (Kadiyala a kol., 2012), čo jednak potvrdzuje účasť epigenetiky na metabolickej pamäti a zároveň vytvára priestor pre nové terapeutické ciele. Špecifickejšia a konkrétnejšia liečba by však mohla priniesť pozitívnejšie účinky v rámci inhibície progresie DR, ako napr. cielený silencing TXNIP pomocou siRNA. Silencing in vivo vedie k eliminácii molekulárnych abnormalít DR, akými sú zápal sietnice, hrubnutie bazálnej membrány endotelových buniek, glióza a smrť gangliových buniek (Perrone a kol., 2010). Použitie tejto najmodernejšej techniky zacielenej na gény asociované s ochorením by bolo obzvlášť účinné na „vymazanie“ metabolickej pamäte, čiže na zvrátenie negatívneho dopadu u pacientov so zle kontrolovanou glykémiou. Týmto spôsobom sa dajú navrhnuť terapie zamerané na množstvo ďalších cieľových DNA, prípadne RNA molekúl. Avšak epigenetický výskum čelí viacerým problémom. Epigenetické vzory sú bunkovo špecifické, výsledky väčšinou pochádzajú z heterogénnych tkanivových vzoriek, preto je ich náročné interpretovať. Zároveň hyperglykémia nie je jediný rizikový faktor DR, pretože na zmene epigenetických značiek v cieľových tkanivách sa podieľa spolu s ďalšími faktormi. Ak zhrnieme získané výsledky v oblasti epigenetiky, môžeme jednoznačne konštatovať, že je to perspektívna cesta ďalšieho výskumu v tejto oblasti, ktorá otvára veľké možnosti v detekcii nových biomarkerov, v diagnostike skorých štádií DM a vývoji účinných liečiv. Vhodným námetom pre ďalšie experimentálne výskumy je preverenie po akej dlhej dobe, a či vôbec, dochádza k zvráteniu epigenetických následkov hyperglykémie, a akou mierou sa na tom podieľajú správne stravovacie návyky a cvičenie.

6. INÉ PRÍSTUPY ŠTÚDIA DIABETICKEJ RETINOPATIE (BIOMARKERY, PROTEOMIKA, METABOLOMIKA)

Biomarkery umožňujú identifikovať a napomáhajú monitorovať priebeh jednotlivých štádií DR, zhoršenie zdravotného stavu pacienta alebo efektívnosť liečby. Existujú **prognostické markery** (systémové alebo genetické), ktoré predpovedajú možný priebeh ochorenia s liečbou alebo bez nej. Súvisia s markermi hyperglykémie, vysokým krvným tlakom, množstvom lipidov, s rôznymi sérovými markermi zápalu, endotelovou dysfunkciou a oxidačným stresom. **Prediktívne markery** predpovedajú najpravdepodobnejšiu reakciu na liečbu. V súčasnosti jediný validovaný **systémový biomarker** pre rozvoj DR je **glykovaný hemoglobín** (Cunha-Vaz a kol., 2014). Iné navrhnuté markery sú množstvo N-karboxymetyl-lyzínu (CML) v sére, ktoré je asociované so závažnosťou DR (Ghanem a kol., 2011) a množstvo asymetrického dimetylarginínu (ADMA) v sére, ktorý býva zvýšený u diabetických pacientov s DR (Abhary a kol., 2009). Napriek tomu, že systémové markery sú relevantné faktory, nedá sa na ich základe predpovedať, ako sa bude DR ďalej rozvíjať, prípadne progredovať (Hove a kol., 2006).

Hlavné navrhnuté biomarkery sú založené na patofyziologických procesoch zapojených do rozvoja DR alebo súvisia so štrukturálnymi poškodeniami v sietnici. Sietnica tvorí malý podiel z celkovej hmotnosti tela, ideálny marker by mal byť preto vysoko špecifický pre sietnicu, aby preukázal odrazil fyziologický stav sietnice. Identifikácia genetických markerov, ktoré by umožnili vytypovať jedincov so zvýšenou náchylnosťou na DR ešte v predklinickom štádiu, je veľmi perspektívna. Umožnila by aplikovať efektívne preventívne zákroky. Je totiž jednoznačne potvrdené, že čím v skorších štádiách vývinu sa zachytí DR, tým sú preventívne zákroky efektívnejšie a v konečnom dôsledku môžu zachrániť zrak diabetika. Doteraz sa nepodarilo detegovať genetické biomarkery na štatisticky významnej úrovni, čo znamená, že samotné gény doposiaľ neboli zaradené do diagnostických metód ako rizikové faktory DR (Simó-Servat a kol., 2013).

Rozvoj a progresia DR nie sú homogénne u všetkých pacientov a závisia od genetických faktorov, ktoré však nie sú dostatočne objasnené. Zároveň úlohy jednotlivých dráh zapojených do patofyziologických procesov nie sú u všetkých pacientov rovnaké. Pre jednu skupinu pacientov je esenciálnym krokom pri rozvoji diabetickej retinopatie aktivácia RAGE, u iných pacientov prevládajú zápalové procesy (Simó, Hernández, 2015). Terapia môže byť zameraná na niektoré dráhy zapojené do DR s cieľom zmierniť symptómy ochorenia. Avšak genetická variabilita v zúčastnených génoch môže vyvolať rozdielne reakcie na liečbu, čo je dôvodom zapojenia **farmakogenetiky** do hľadania nových liečebných postupov. Napríklad bolo pozorované prepojenie *VEGF* polymorfizmu c. C-634G a anti-VEGF terapie. Konkrétne pacienti s CG a GG genotypmi mali menšiu pravdepodobnosť účinnosti liečby (Cho, Sobrin, 2014). Zanedbanie genetických odlišností jednotlivých testovaných subjektov v štúdiách zaoberajúcich sa testovaním účinnosti terapií môže viesť k zavrhnutiu diagnostického markera alebo potenciálne účinnej novej terapie.

Hlavnou úlohou **proteomiky** je porovnanie vitreálneho proteómu (súboru proteínov, ktoré sú produkované z genómu daného organizmu) zdravých a diabetických pacientov s rôznymi štádiami DR, v kontexte s typom diabetu. Jedným z hlavných cieľov je objasniť, prečo u značnej časti pacientov s DM2 neprechádza DR až do slepoty. Proteomické výskumy odhalili zmeny v biologických dráhach, akými sú mediátory zápalu, koagulácie a komplementu (Kuo a kol., 2014). Z dôvodu prirodzeného multifaktoriálneho charakteru DR je pravdepodobnejšie, že jeden proteín nebude iniciovať osamotene rozvoj ochorenia, ale že k patofyziologickým procesom pri vzniku DR prispieva viacero proteínov lokalizovaných v sklovci. Aj v tejto oblasti sú nutné ďalšie výskumy.

V ostatnom období sa **metabolomika** javí ako silný nástroj na sledovanie zmien metabolitov a metabolických dráh v biologických systémoch. Umožňuje pozorovať, klasifikovať a vyhodnocovať komplexné biochemické alternácie počas rozličných štádií ochorenia (Li a kol., 2011), pričom berie do úvahy genetický profil, alternatívne enzymatické aktivity a životný štýl (Kuo a kol., 2014). Li a kol. (2011) pozorovali zmeny mastných kyselín (kyselina steárová, linolénová a arachidónová), aminokyselín (kyselina asparágová) a glukózy, ktoré varírovali medzi jednotlivými skupinami diabetických pacientov s diabeticou retinopatiou alebo bez nej, a s NPDR alebo PDR.

Sekvenovanie novej generácie (NGS) bolo prelomom v genomických štúdiách aplikovaných v medicíne a vytvorilo nové možnosti k porozumeniu širokého spektra procesov podieľajúcich sa na rozvoji ochorení. Sú to techniky, ktoré využívajú iné metodické postupy ako klasické sekvenovanie a umožňujú súčasne analyzovať viacero DNA vzoriek za podstatne kratší čas. K NGS metódam patrí pyrosekvenovanie (systém 454 Life Sciences), sekvenovanie syntézou (systém Illumina), sekvenovanie ligáciou (systém SOLiD) a *Ion Semiconductor Sequencing* – polovodičové iónové sekvenovanie. Jednou z výhod NGS je produkcia enormného množstva dát za nižšie finančné náklady. NGS platformy môžu byť aplikované v rámci rôznych odvetví, ako sú genomika, transkriptomika, proteomika. NGS umožňuje získanie nových dát neporovnateľne rýchlejšie a z väčšieho množstva vzoriek než štandardne používané metódy, či už pri celogenómovom sekvenovaní, cielenom resekvenovaní alebo RNA sekvenovaní (vrátane miRNA). Vyhodnocovanie veľkého množstva dát môže viesť k lepšiemu opisu genetickej variability ľudských génov a odhaleniu dôležitých zmien vedúcich k vzniku ochorení, a teda identifikácii adekvátnych diagnostických markerov. Momentálne sa zavádzajú techniky tretej generácie sekvenovania, ktorých výhodou je, že analyzovaný úsek nie je potrebné namnožiť pomocou PCR, ale sekvencia sa získava zachytením signálu v reálnom čase. Medzi sekvenovanie tretej generácie patrí SMRT (*Single Molecule Real-Time Sequencing*) a *Nanopore Sequencing*.

Samotné prepojenie a aplikácia možností proteomiky, metabolomiky a NGS môže viesť k prelomovým zisteniam o multifaktoriálnom ochorení ako je DR, ktoré umožnia úspešnejšiu diagnostiku najmä v skorších štádiách postihnutia sietnice a cielenú liečbu.

7. TERAPEUTICKÉ PRÍSTUPY A PERSPEKTÍVY

K rozvoju diabetickej retinopatie prispieva široké spektrum faktorov vedúcich ku konkrétnym patologickým dejom v sietnici. Súčasné liečebné postupy sa zameriavajú na systémové zvládnutie choroby, teda kontrolu hladiny glukózy v krvi, krvného tlaku a množstva lipidov v krvi. Cieľom liečby je dosiahnuť kompenzovaný *diabetes mellitus*. Medikamentózna liečba je podporná a slúži na zmiernenie symptómov DR. Súčasné terapeutické postupy nie sú vôbec zacielené na prvé príznaky patofyziologických procesov v oku, ale až pokročilé štádiá DR sú dôvodom iniciácie liečby. Pristupuje sa k laserovej fotokoagulácii, injekciám kortikosteroidov lokálne do sklovca na zmiernenie zápalu, anti-VEGF terapii a vitreo-retinálnym operáciám. Kortikosteroidy, okrem svojej protizápalovej aktivity, znižujú vaskulárnu permeabilitu, zmierňujú rozpad HRB a znižujú produkciu VEGF (Fangueiro a kol., 2015). Komplikácie vyskytujúce sa po podávaní kortikosteroidných injekcií sú relatívne časté. Najčastejšie sa vyskytuje zvýšenie vnútroočného tlaku a tvorba katarakty (šedého zákalu). Z týchto dôvodov sú aplikované len pri perzistentných diabetických edémoch makuly (Bandello a kol., 2014).

Laserová fotokoagulácia je neinvazívna liečebná metóda založená na použití zacieleného laserového lúča do konkrétnych oblastí sietnice, kde tkanivo absorbuje lúč. Aplikovaný laser uzatvára mikroaneuryzmy, zastavuje presakovanie z kapilár, stimuluje reparačnú aktivitu endotelových buniek sietnice (Kiňová a kol., 2013). Absorpcia tkanivom vedie k lokálnemu zvýšeniu teploty, ktorá indukuje denaturáciu proteínov a koagulačnú nekrózu (Fangueiro a kol., 2015). Je indikovaná najmä na liečbu klinicky významného diabetického edému makuly. Ak je aplikovaná včas, zabráňuje ďalšiemu zhoršovaniu zraku, ale zvyčajne sú už vyvolané poruchy videnia nezvratiteľné. Laserová koagulácia znižuje riziko závažných porúch zraku o 50 % vo vysokorizikovej skupine pacientov (Calcutt a kol., 2009). Fotokoagulácia môže mať aj vedľajšie nežiaduce účinky, ako sú napríklad poruchy adaptácie na zmeny svetla, zníženie ostrosti videnia, strata periférneho videnia, zmeny vo farebnom videní a zhoršenie DME (Simó, Hernández, 2015).

Pars plana vitrektómia je forma endoskopickej chirurgie, ktorá slúži na odstránenie krvi z tekutiny sklovca, nadbytočného väziva a novovytvorených ciev. Aplikuje sa hlavne v prípade pokročilej retinopatie s proliferáciou, pri hrozbe straty zraku alebo závažných

poruchách videnia. Možný vedľajší efekt tohto zákroku je urýchlenie tvorby katarakty, čo môže viesť k rozvoju endoftalmitídy (hnisavého zápalu vnútroočných štruktúr) a odlupovania sietnice (Mason a kol., 2006). Vitreo-retinálne operácie sú finančne náročné a komplikované zákroky, ku ktorým sa pristupuje len pri nevyhnutne hroziacej slepote. Môžu sa vyskytnúť významné pooperačné komplikácie, napríklad katarakty, opakované krvácanie v sklovci, odlúpenie sietnice a neovaskulárny glaukóm (Newman, 2010). Ideálne by bolo nájsť liečebné metódy, ktoré by zabránili prechodu ochorenia do závažnejšieho štádia a eliminovali by nutnosť finančne náročných invazívnych zákrokov (Simó, Hernández, 2015).

Na liečbu retinopatie boli v niektorých krajinách schválené **fenofibrát** a **kalcium dobessilát (CaD)**. **Fenofibrát** má protizápalové, anti-oxidačné, anti-apoptické a anti-angiogénne účinky. Klinické štúdie poukazujú na jeho účinnosť v inhibícii progresie preexistujúcej DR. Toto liečivo je schválené len v Austrálii (Fagan, Chong, 2015). Nedávna systematická prehľadová štúdia a meta-analýza poukázala na to, že podávanie **kalcium dobessilátu** pacientom s DR je spojené s výraznou redukciou tvorby mikroaneuryziem, hemorágií a exudátov v sietnici (Zhang a kol., 2015). CaD zmiernuje oxidačný stres endotelu, znižuje permeabilitu ciev, zlepšuje hemodynamiku úpravou flexibility erytrocytov, a tým vedie k zníženiu viskozity krvi, a následnému zlepšeniu krvného toku v obehu (Kiňová a kol., 2013).

Angiogenéza a neovaskularizácia sú dominantné komplikácie vyvolávajúce PDR a môžu viesť k nenávratnému poškodeniu oka, slepote. Navrhovanie moderných terapií sa zameriava na hľadanie spôsobu ako predchádzať, prípadne inhibovať vznik neželanej neovaskularizácie a angiogenézy. V ostatnom období sa pacientom v pokročilých štádiách DR začali podávať intravitreálne injekcie **monoklonálnych protilátok anti-VEGF**. Podávanie anti-VEGF sa vzhľadom na zachovanie, ale aj zlepšenie zraku pacientov v pokročilých štádiách DR ukázalo účinnejšie než laserová terapia. Najtestovanejšie anti-VEGF liečivá sú **ranibizumab, bevacizumab, pegaptanib a aflibercept**. **Ranibizumab** počas randomizovanej štúdie zlepšil videnie u 46 % pacientov v porovnaní s 18 % pacientov pri použití laserovej fotokoagulácie. Po liečbe ranibizumabom došlo k zhoršeniu zraku u 4 % pacientov v porovnaní s 20 % pacientov, ktorí podstúpili liečbu laserovou fotokoaguláciou.

Napriek účinnosti anti-VEGF terapie je potrebné brať do úvahy, že sa jedná o invazívny zásah, ktorý môže spôsobiť lokálne komplikácie, ako je endoftalmitída a odlúpenie sietnice. Dlhodobé podávanie intravitreálnych anti-VEGF injekcií môže

viest k neurodegenerácii ostatnej zdravej sietnice a poruchám cirkulácie. Riziko podávania anti-VEGF liečiv spočíva v možnosti prechodu liečiva do krvného obehu, čo môže mať za následok vznik hypertenzie, proteinúrie, zvýšené riziko kardiovaskulárnych príhod a zhoršenie hojenia rán (Simó, Hernández, 2015). Iné angiogénne faktory zohrávajúce úlohu v retinálnej neovaskularizácii sú PDGF (rastový faktor odvodený z trombocytov), HGF (hepatocytový rastový faktor), angiopoietíny, bFGF (základný fibroblastový rastový faktor), CTGF (rastový faktor spojivových tkanív) a SDF-1 (faktor 1 odvodený zo stromálnych buniek) (Simó-Servant a kol., 2013). Angiogénne faktory predstavujú možné ciele pre navrhnutie terapií na zabránenie angiogenézy a neovaskularizácie. Jedným z ďalších liečiv je **endostatín**, účinný inhibítor angiogenézy. Endostatín je zodpovedný za inhibíciu VEGF, chemokínov, CXCL1, MMP a moduláciu transkripčných faktorov AP-1 a NF- κ B. Aktuálne je v štádiu klinického testovania, s cieľom zistiť jeho efektivitu ako anti-angiogénneho faktora počas DR (Behl, Kotwani, 2015).

Neovaskularizácia v sietnici počas diabetickej retinopatie je lokalizovaná v sklovci, ale zlyháva v ischemických oblastiach, čo naznačuje pôsobenie určitých vazorepulzívnych signálov. **Semaforín 3A** je vylučovaný z hypoxických neurónov ako odpoveď na zápalové cytokíny. Vytvára chemickú bariéru, ktorá zabraňuje neovaskularizácii v ischemickej sietnici myši (Joyal a kol., 2011). Inhibícia semaforínu 3A u diabetickej myši zabraňuje retinálnemu vaskulárnemu presakovaniu (Cerani a kol., 2013). Tieto zistenia naznačujú, že terapie zacielené na tento proteín by mohli viesť k zabráneniu aberantnej neovaskularizácii počas DR.

Väčšina inovátnych terapeutických postupov je navrhovaná na základe výsledkov animálnych štúdií. Nevýhodou je absencia ideálneho animálneho modelu, ktorý by verne napodobnil diabetickej retinopatiu u ľudí. Používaných je niekoľko živočíšnych druhov, vrátane myši, potkanov, psov, prasiat a primátov. Najpoužívanejším modelom sú myši, vďaka krátkemu reprodukčnému cyklu a širokým možnostiam techník genetickej manipulácie s nimi. Nevýhodou však je absencia makuly (žltej škvrny) u myši, ktorá znemožňuje výskum niektorých aspektov DR a prípadných terapeutických možností na tomto modeli (Simó, Hernández, 2015).

Hyperglykémia je hlavný induktor diabetickej komplikácií. Zacielenie terapie

na glukózou sprostredkované patologické procesy, ako je vaskulárna dysfunkcia, inhibícia RAGE signalizácie, polyolová dráha a oxidačný stres, je lákavý terapeutický prístup, pretože by mohol byť účinný voči viacerým diabetickej komplikácii súčasne (Calcutt a kol., 2009). AGEs, koncové produkty glykácie, majú toxický účinok na pericyty sietnice a vaskulárne endotelové bunky. Môžu tiež aktivovať astrocyty a gliové Müllerove bunky, čo prispieva k zápalu a produkcii pro-zápalových cytokínov, vrátane TNF α , IL-1 β a MCP-1 v sietnici. Cesta k účinnej terapii diabetickej retinopatie by mohla byť zabezpečená inhibíciou tvorby AGEs, blokovaním interakcie medzi AGEs navzájom alebo atenuáciou (zoslabením) nimi aktivovanými signálnymi dráhami. Inhibícia receptorov pre AGEs (RAGE) fúziom proteínom (obvykle kódovaný spojenými dvomi prípadne viacerými pôvodne samostatnými celými génmi, alebo len ich časťami, do jedného výsledného génu) vedie k zabráneniu tvorby lézií na sietnici. Vitamín B6 je jedným z inhibítorov produkcie AGEs, a zároveň redukuje ich akumuláciu (Simó, Hernández, 2015). Inhibitory AGEs sú napr. aminoguanidín a karnozín (Fangueiro a kol., 2015).

Somatostatíny (SST) regulujú sekréciu somatotropného (rastového) hormónu a majú opačné účinky ako rastový hormón, teda antiproliferačný, antiangiogénny a neuroprotektívny. V pokročilom štádiu DR a počas DME sa znižuje produkcia SST, čo sa výrazne prejaví na ich množstve v sklovci. Zníženie produkcie sa objavuje v skorých štádiách DR a je spojené s neurodegeneráciou sietnice (Carrasco a kol., 2007). Oktreotid je somatostatínový analóg, inhibuje rastový hormón a je používaný v terapii DR. Podávanie oktreotidu pravdepodobne reguluje odpoveď ciev na hypoxické prostredie v sietnici prostredníctvom modulácie množstva VEGF a jeho receptora (Palii a kol., 2008).

Inhibitory proteín kinázy C predstavujú možný spôsob prevencie neovaskularizácie. PKC dráha zohráva fundamentálnu úlohu v transdukcii signálu a iniciácii patofyziologických procesov DR. Hyperglykémia priamo aktivuje PKC, čo vedie k zvýšenej cievnej permeabilite, zmenám bazálnej membrány a stimulácii angiogenézy. Z tohto dôvodu boli navrhnuté terapeutické prístupy založené na princípe inhibície PKC. Prvá a druhá generácia PKC inhibítorov bola určená na experimentálne účely (napr. staurosporín, isoquinolínsulfonamidy) a neboli špecifické voči konkrétnym izoformám PKC. V roku 1996 bol pripravený ruboxistaurín, ktorý špecificky inhiboval izoformy PKC- β I a PKC- β II. Podávanie ruboxistaurínu znížilo aktivitu PKC, upravilo krvný prietok v sietnici u pacientov s oboma typmi diabetu. Ruboxistaurín taktiež inhiboval mitogénnu odpoveď na VEGF v animálnych

modeloch (prasatá), z čoho vyplýva, že práve PKC- β je esenciálnym mediátorom migrácie a proliferácie endotelových buniek vyvolaných VEGF. Inhibícia PKC vedie k zníženiu miery procesu angiogenézy. Podávanie ruboxistaurínu spôsobilo aj zníženie adhézie leukocytov v mikrovaskulárnom riečisku sietnice. V roku 2006 bola firmou Eli Lilly podaná žiadosť o autorizáciu ruboxistaurínu. Americká FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) žiadosť schválila pod podmienkou dodatočných klinických testov, na čo spoločnosť Eli Lilly svoju žiadosť stiahla. Odvtedy prebehlo niekoľko klinických testov, ktoré zatiaľ neviedli k uvedeniu liečiva na trh (Bansal a kol., 2013).

Hypertenzia zhoršuje priebeh diabetickej retinopatie, konkrétne vedie k skoršiemu nástupu a závažnejším zápalovým procesom v sietnici charakterizovanými zvýšenou expresiou ICAM-1, VEGF a NF- κ B. Aktivácia angiotenzínového receptora angiotenzínom, ktorý sa podieľa na regulácii krvného tlaku, stimuluje viacero dráh zapojených do patofyziológie DR, vrátane zápalu, oxidačného stresu, akumulácie AGEs, neurodegenerácie, leukostázy a aktivácie mediátorov angiogenézy (Amano a kol., 2003). Farmakologická blokáda receptora vedie k oslabeniu týchto dejov (Wilkinson-Berka, 2006). **Kandesartan** je blokátor receptora pre angiotenzín II. Randomizovaná, dvojito zaslepená štúdia DIRECT (*Diabetic Retinopathy Candesartan Trial*), počas ktorej sa pacientom podávalo placebo alebo kandesartan, poukázala na dôležitosť RAA systému v patogenéze DR. U pacientov s diabetom typu 1 znižoval výskyt DR o 18 %. V prípade diabetikov typu 2, kandesartan znížil incidencia DR o 34 % u pacientov s retinopatiou v skorých štádiách (Chaturvedi a kol., 2008; Sjölie a kol., 2008). Antihypertenzívna liečba *losartanom* (blokátor ANGTRI) zmierňuje symptómy diabetickej retinopatie v animálnych modeloch (Silva a kol., 2007). Losartan taktiež redukuje poškodenie sietnice vyvolané zápalom a oxidačným stresom znížením produkcie oxidu dusnatého (Silva a kol., 2010).

Inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACEI) majú vplyvom znižovania tlaku krvi protektívny účinok voči vzniku edému makuly a retinopatie. Tieto zistenia naznačujú, že blokáda RAA systému má antioxidantné, anti-apoptotické a protizápalové účinky, ktoré by mohli prispieť k liečbe DR. Avšak klinické štúdie nepriniesli požadované výsledky efektívnosti farmakologických blokad rôznych častí RAA systému na zavedenie do klinickej praxe (Simó, Hernández, 2015).

Jedným z hlavných induktorov diabetickej retinopatie je **oxidačný stres** vyvolaný

primárne hyperglykémiou a následnou aktiváciou metabolických dráh vznikom kyslíkových radikálov. Sietnica je výrazne citlivá voči oxidačnému stresu najmä z dôvodu vysokých energetických nárokov. Dochádza k dysfunkcii mitochondrií, čo výrazne urýchľuje apoptózu retinálnych buniek. Superoxiddismutáza je prvou líniou obrany voči superoxidovým radikálom (Rosales a kol., 2010). Superoxidové radikály vyvolávajú okrem poškodenia proteínov a lipidov aj poškodenie DNA tvorbou oxidačne modifikovaného guanínu (8-OHdG – 8-hydroxy-2-deoxyguanozín), čo vedie k nezvratným genotoxickým zmenám. Podávanie antioxidantov (napríklad zeleného čaju, kakaa, SOD mimetik, vitamínu E alebo doplnkov stravy so zeaxantínom, luteínom, kyselinou lipovou, omega-3 masnými kyselinami) hladavcom predstavuje účinnú prevenciu mikrovaskulárnych poškodení (Simó, Hernández, 2015). Podávanie SOD mimetika, tempolu, obnovilo endotelovú vazodilatáciu v modelových organizmoch, znížilo mieru leukostázy, pravdepodobne redukciami tvorby ROS (Rosales a kol., 2010). Animálne štúdie, kde zvieratám podávali antioxidanty, flavonoidy v strave (zelený čaj, kakao, vitamín C a E), poukázali na zníženie vplyvu oxidačného stresu na retinálne bunky. Zabránenie inhibície retinálnej glutatiónereduktázy, glutatióneroxidázy a aktivity SOD viedlo k zlepšeniu stavu testovaných jedincov (Mustata a kol., 2005). Ďalšia štúdia na 381 zúčastnených pacientoch preukázala, že zvýšená konzumácia ovocia s vysokým obsahom flavonoidov bola asociovaná s 30 % znížením rizika vzniku DR (Mahoney a kol., 2014). Avšak klinických štúdií na túto tému je málo a majú nepreukazné výsledky. Súhrn testovaných flavonoidných látok na animálnych modeloch s ich účinkom je uvedený v publikácii Testa a kol., 2016.

7.1. DYSLIPIDÉMIA

Dyslipidémia je jedným z hlavných rizikových faktorov vzniku kardiovaskulárnych ochorení. Prísna glykemická kontrola a kontrola krvného tlaku znižujú riziko vzniku a mieru progresie diabetickej retinopatie, avšak úloha lipidov v patogenéze DR nie je úplne objasnená (Chang, Wu, 2013). Zo spomínaných metabolických a signálnych dráh pozmenených hyperglykémiou sú za zmeny množstva lipidov počas DR pravdepodobne zodpovedné PKC signálna dráha a nadmerná akumulácia AGEs.

Zvýšená akumulácia masných kyselín s dlhým reťazcom, typický znak dyslipidémie, vedie k ich zvýšenej transformácii na diacylglycerol, hlavný aktivátor PKC. Sietnica je

vystavená intenzívnemu oxidačnému stresu, následkom čoho dochádza k akumulácii lipidov a modifikácii proteínov, čo vedie k nahromadeniu **koncových produktov pokročilej lipooxidácie (ALEs)**. ALEs je pomenovanie pre skupinu produktov vznikajúcich neenzymatickou reakciou **reaktívnych foriem uhlíka (RCS, reactive carbonyl species)**. RCS sú tvorené peroxidáciou lipidov a reakciou lipidov s nukleofilnými zvyškami makromolekúl (Vistoli a kol., 2013). Patogénny účinok ALEs je veľmi obdobný pôsobeniu AGEs, teda strata funkcie modifikovaných proteínov, tvorba krížových väzieb medzi proteínmi, vedúca k štruktúrnym aj funkčným zmenám zasiahnutých proteínov.

Štúdie zaoberajúce sa vzťahom medzi dyslipidémiou a vznikom DR priniesli rozporuplné výsledky. Maioli a kol. sledovali množstvo **lipoproteínu (a) (Lp(a))** u pacientov s prvým typom diabetu trvajúcim minimálne 15 rokov (jedna skupina pacientov mala DR, druhá nevykazovala detekovateľné zmeny na sietnici, tretia skupina bola kontrolná, teda tvorená zdravými jedincami). Preukázali, že hladina sérového Lp (a) bola výrazne vyššia u pacientov s retinopatiou (Maioli a kol., 1993). Suehiro a kol. potvrdili rovnaké výsledky aj pri druhom type diabetu, kde najvýraznejšie zvýšenie množstva Lp (a) bolo pri PDR (Suehiro a kol., 2002). Niektoré ďalšie štúdie však štatisticky významné zmeny Lp (a) nezaznamenali (Winocour a kol., 1991; Boemi a kol., 1997).

Santos a kol. sledovali súvislosť medzi polymorfizmami v géne pre **apolipoprotein E (ApoE)** a mierou produkcie tvrdých exudátov v sietnici. Zdá sa, že alela epsilon4 je potenciálny rizikový faktor zodpovedajúci za vyššiu mieru tvorby tvrdých exudátov a straty zraku pri DR u pacientov s DM1 v mexickej populácii (Santos a kol., 2002).

Bola taktiež pozorovaná významná asociácia medzi zníženým množstvom **apolipoproteínu A1 (ApoA1)** a vznikom PDR. ApoA1, súčasť HDL-C, môže spúšťať vazoprotektívne mechanizmy vďaka schopnosti indukovať spätný transport cholesterolu z periférnych tkanív do pečene a zabrániť oxidácii LDL-C. LDL-C pôsobí cytotoxicky na bunky hladkého svalstva a spôsobuje endotelovú dysfunkciu. ApoA1 je kľúčový faktor brániaci akumulácii lipidov v sietnici a chráni sietnicu pred oxidačným stresom (Hu a kol., 2012).

V súčasnosti sa testuje protektívny účinok niekoľkých liečiv znižujúcich množstvo lipidov v organizme. **Fenofibrát** je agonista receptora pre PPAR (peroxizómovým proliferátorom aktivovaný receptor) a zmierňuje dyslipidémiu. Použitie fenofibrátu prospešne vplyva

na produkciu tvrdých exudátov v sietnici, čo však nespôsobilo výrazné zlepšenie videnia, no z dlhodobého hľadiska sa znižovala pravdepodobnosť potreby laserovej fotokoagulácie, či vzniku DME (Chang, Wu, 2013). Klinické štúdie zamerané na prospešný účinok statínov (dlhodobo najpoužívanějších liekov na liečbu hypercholesterolémie) pri DR priniesli nejednoznačné výsledky (Zhang, McGwin, 2007).

Terapeutiká znižujúce množstvo lipidov môžu byť efektívne používané ako adjuvantná liečba pri zvládnutí priebehu diabetickej retinopatie popri prísnej kontrole glykémie a krvného tlaku. Pre pochopenie presnej úlohy dyslipidémie v patogenéze DR sú však nevyhnutné dodatočné výskumy.

7.2. NEURODEGENERÁCIA

Diabetická retinopatia je považovaná za mikrovaskulárne ochorenie retiny. Objavujú sa však dôkazy, že v skorých fázach DR zohráva úlohu v patofyziológii ochorenia **neurodegenerácia sietnice** (Simó, Hernández, 2014). Prepojenie a mechanizmus signalizácie medzi neurodegeneratívnymi procesmi a mikroangiopatiou prináša ďalšie možnosti v navrhnutí nových terapeutických prístupov.

Sietnica sa skladá z niekoľkých vrstiev neurónov (neuroretina), z monovrstvy pigmentových buniek (RPE, retinálny pigmentový epitel) a cievovky (chorioidea), ktorá zabezpečuje výživu retiny. Neuróny citlivé na svetlo sú fotoreceptorové bunky (tyčinky, čapíky a fotosenzitívne gangliové bunky). Pre správne videnie je nevyhnutná neurálna integrita. U diabetických pacientov bolo pozorované zhoršené rozoznávanie odtieňov a kontrastov, spomalené prispôbenie sa tme a abnormálne zorné pole, a to i bez rozvoja mikrovaskulárnych abnormalít. Tieto zmeny boli detegované pomocou **multifokálneho elektroretinografu (mfERG)**. MfERG je metóda využívaná v očnom lekárstve a zaznamenáva elektrické potenciály, ktoré vznikajú stimuláciou fotoreceptorov pomocou svetla. Tvar krivky elektroretinografu závisí od intenzity, dĺžky a farby stimulu (Hrazdira, Mornstein, 2001). Predĺženie implicitného času odpovede na stimul pri ERG je prediktorom rozvoja viditeľných vaskulárnych abnormalít v priebehu jedného až troch rokov (Simó, Hernández, 2015).

Neurálna apoptóza a reaktívna glióza (zmnoženie gliálnych buniek) sú charak-

teristické pre neurodegeneráciu sietnice . Vyskytujú sa u diabetických pacientov aj bez prítomnosti abnormalít mikrocirkulácie prípadne len s miernymi príznakmi DR. Neuronálne degenerácie vedú k stenšeniu neuroretíny.

Miera a význam účasti neurodegeneratívnych procesov v skorých štádiách DR nie je úplne jasná. K odhaleniu súvislostí týchto procesov by mohla napomôcť prebiehajúca klinická štúdia EUROCONDOR (EudraCT Number: 2012-001200-38), ktorá sa zameriava na vplyv **neuroprotektívnych látok** (somatostatínu a brimonidínu) u diabetických pacientov. Možnosť zmiernenia následkov neurodegenerácie v sietnici je niekoľko. Dôležitú úlohu pri zániku neurónov zohráva akumulácia glutamátu. **Glutamát** je hlavný neurotransmiter v retine a jeho množstvo je zvýšené v extracelulárnom priestore v diabetických experimentálnych modeloch, a tiež v sklovci diabetikov s PDR (Simó, Hernández, 2014). Nadbytok glutamátu vedie k nadmernej aktivácii ionotropných glutamátových receptorov (receptor je súčasne iónový kanál), hlavne AMPA a NMDA receptorov, čo vyúsťuje v nekontrolovanú intracelulárnu odpoveď v postsynaptických neurónoch a v bunkovú smrť (Ng a kol., 2004). Tento jav sa nazýva excitotoxicita. Použitie blokátorov glutamátových receptorov, konkrétne memantínu, viedlo k zmierneniu procesu neurodegenerácie a vaskulárnych abnormalít u diabetických myší (Kusari a kol., 2007).

Produkcia endogénnych neuroprotektívnych faktorov, ako je napr. **PEDF (faktor derivovaný z pigmentového epitelu)** a **SST (somatostatín)**, je v sietnici diabetikov znížená. Znížená expresia týchto faktorov môže narušiť schopnosť sietnice odolávať neurotoxickým agensom. Okrem zníženia produkcie neuroprotektívnych faktorov v sietnici, dochádza aj k zvýšenej produkcii neurotrofných a tzv. *survival* faktorov, ako je VEGF a erytropoetín. K týmto zmenám dochádza v skorých štádiách DR a nie sú indukované ischémiou (Simó, Hernández, 2014). Podávanie prírodných neuroprotektívnych faktorov, ktorých je nedostatok v diabetických sietniciach, môže byť ďalší spôsob boja voči neurodegenerácii. K takýmto faktorom patrí PEDF, SST, kortistatín, neurotrofíny (Simó, Hernández, 2015).

PEDF má neurotrofné, neuroprotektívne, anti-angiogénne, anti-vazopermeabilné, anti-zápalové a anti-oxidačné účinky. Intravenózne podávanie PEDF diabetickým myšiam viedlo v skorých štádiách DR k inhibícii leukostázy, zabránilo neurálnym komplikáciám a vaskulárnej hyperpermeabilite prostredníctvom inhibície oxidačného stresu (Yoshida a kol., 2009). PEDF znižuje expresiu chemických mediátorov zápalu, ako je VEGF, TNF- α , ICAM-1

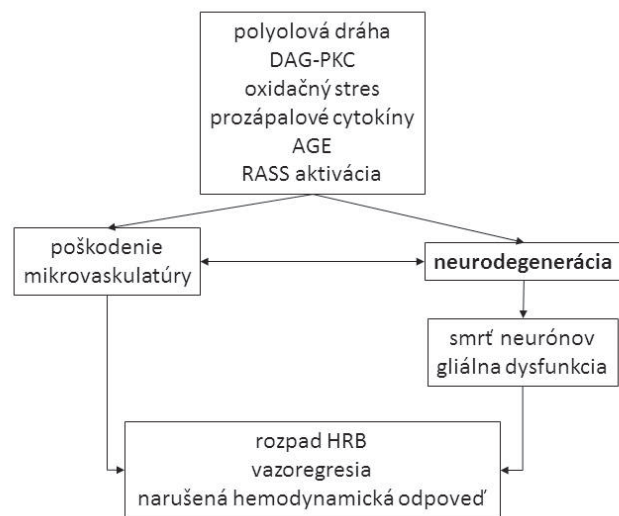
v endotelových bunkách ciev sietnice. Znižuje taktiež mieru akumulácie glutamátu (Simó, Hernández, 2015). Meta-analýza však neodhalila asociáciu medzi polymorfizmami v tomto géne a vznikom DR (Abhary a kol., 2009).

V sklovci DR pacientov je významne znížené množstvo **somatostatínu**, čo je asociované s retinálnou neurodegeneráciou. Podávanie SST diabetickým potkanom zmiernilo tieto procesy. Došlo pravdepodobne k vyrovnaní diabetom vyvolanej nerovnováhy medzi proapoptickými a anti-apoptickými signálmi a redukcii akumulácie glutamátu (Simó, Hernández, 2015).

Intravitreálne podávanie **erytropoetínu** chráni diabetické potkany pred neurogliálnou a vaskulárnou degeneráciou v sietnici, čo by mohlo naznačovať pozitívny účinok EPO spočívajúci v neuroprotekcii, stabilizácii ciev a zvýšenej miery reparácie tkanív. Avšak EPO môže zosilňovať účinok VEGF, čo by naopak viedlo k zhoršeniu stavu a podpore neovaskularizácie (Grant a kol., 2008).

Doxycyklín (tetracyklínové antibiotikum) má protizápalové a neuroprotektívne vlastnosti nezávislé na jeho antibakteriálnom účinku. Nízke dávky doxycyklínu zlepšujú funkciu sietnice u diabetických pacientov so závažnou NPDR alebo s PDR (Scott a kol., 2014).

Stále sa vynárajú dôkazy, že neurodegenerácia sa podieľa na skorých mikrovaskulárnych zmenách v diabetickej sietnici, rozpade HRB, vazoregresii a neurovaskulárnom prepojení (obr. 16). Hyperglykémia pravdepodobne indukuje zvýšené množstvá extracelulárneho glutamátu vedúce k nadmernej aktivácii NMDA receptorov. Aktivované receptory vyvolajú produkciu VEGF a rozpad HRB (Kusari a kol., 2010). K týmto dejom prispieva aj gliálna dysfunkcia. Vazoregresia je primárna odpoveď mikrociev sietnice na chronickú hyperglykémiu a je charakterizovaná stratou pericytov s následnou tvorbou acelulárnych kapilár (Simó, Hernández, 2014).



Obr. 16 Procesy vedúce k symptómom diabetickej retinopatie a postavenie neurodegenerácie v patofyziologických procesoch. DAG-PKC – diacylglycerol-proteínkináza C, AGEs – koncové produkty pokročilej glykácie, RAAS – renín-angiotenzín-aldosterón systém, HRB – hema-to-retinálna bariéra (upravené a preložené podľa Simó, Hernández, 2014)

Terapeutické postupy založené na neuroprotekcii otvorili nové možnosti hľadania účinných preventívnych opatrení u pacientov s DR. Zabránenie neurodegenerácie by zmiernilo mikrovaskulárne poškodenie v neskorších fázach DR. K výrazne pozitívnym výsledkom by mohla viesť súčasná redukcia oxidačného stresu spolu s podávaním neuroprotektívnych látok. **Kyselina askorbová** je účinný antioxidant, ktorý sa zúčastňuje na produkcii neuro-peptidov a inhibuje VEGF, a práve štádium PDR je charakteristické znížením jej množstva v sklovci pacientov. Podávanie kyseliny askorbovej môže potenciálne zmierniť príznaky DR na sietnici (Barba a kol., 2010).

Pre zavedenie neuroprotektívnej liečby je esenciálna skorá identifikácia znakov neurodegenerácie. Väčšina pacientov je však v tomto štádiu asymptomatická, preto nie sú adekvátne agresívne spôsoby liečby. Je nutné vytvoriť a vyhodnotiť viaceré klinické štúdie, ktorých cieľom bude zistiť optimálny spôsob podávania liečiv a stanoviť ich najúčinnjšiu koncentráciu.

Odhalenie neurodegenerácie v patogenéze DR poskytuje nový pohľad na navrhnutie nových účinných diagnostických metód a terapií.

7.3. NANOMEDICÍNA

Nanomedicína je medicínsky odbor zaoberajúci sa aplikáciou nanotechnológií v klinickej medicíne. Nadväzuje hlavne na molekulárnu medicínu. **Nanočastice** (1-1000 nm) sú používané s rôznym klinickým zameraním, pričom môžu byť použité ako nosič danej látky (terapeutika) do organizmu s cieľom liečby alebo prevencie ochorenia. Nanočastice poskytujú množstvo výhod oproti podávaniu terapeutík samostatne alebo klasickými spôsobmi. Väčšina terapeutík je problematická, najmä z dôvodov slabej rozpustnosti, vysokej toxicity, nutnosti vysokého dávkovania pre dosiahnutie terapeutického efektu, agregácie, enzymatickej a chemickej degradácie, a tiež pomalého rozpadu. Vloženie terapeutika do nanočastice prekonáva tieto limitácie a navyše umožňuje cielene doručiť terapeutikum na želané miesto účinku, do špecifických buniek alebo tkaniva (Fangueiro a kol., 2013; Fangueiro a kol., 2015).

Anatomicky je oko izolovaný orgán rozdelený na prednú a zadnú časť. Účinok liečiva aplikovaného lokálne pomocou očných kvapiek je obmedzený len na prednú časť oka. Aby liečivo dosiahlo zadnú časť oka, je ho možné aplikovať cez spojovku (prekrvenú sliznicu pokrývajúcu povrch oka a vnútornú stranu viečok), očné bielko alebo rohovku, napr. pomocou invazívnych metód, ako sú intravitreálne injekcie a implantáty. Liečivo môže pôsobiť na zadnú časť oka aj v prípade, že sa tam dostalo z krvného obehu (Al-Halafi, 2014). Takto podané liečivo však musí prekonať niekoľko anatomických bariér, akými sú epitel a endotel rohovky, endotelálne bunky sietnice, pigmentový epitel sietnice, a nevýhodou je aj potreba väčších dávok, ako pri lokálnom podávaní.

Najštudovanejšie nanočastice testované pri DR sú **polymerické nanočastice** a **lipidové nanočastice**. Medzi lipidové nanočastice patria tuhé lipidové nanočastice (SLN – *solid lipid nanoparticles*), nanoštruktúrne lipidové nosiče (NLC – *nanostructured lipid carriers*), lipozómy, lipozómy pokryté polyetylén glykolom, dendriméry a kationové nanoemulzie. Lipozómy sú laboratórne vytvorené nosiče, ktoré umožňujú vniesť nukleovú kyselinu (NK)

do bunky. Majú fosfolipidovú štruktúru s typickou hydrofilnou a hydrofóbnou zložkou. Fosfolipid obklopuje malé množstvo vody, v ktorej je rozpustená nukleová kyselina. Veľkosť prenášanej NK je neobmedzená. Pri spojení s cieľovou bunkou splynú lipozóm s bunkovou membránou, čím umožní vstup nukleovej kyseliny do bunky. Výhodou je nízka toxicita lipozómov a to, že nevyvolávajú imunitnú odpoveď.

Kombinácia klasických liečiv s nanočasticami pomáha prekonať limitácie liečiv a zvýšiť ich účinnosť pri nižších dávkach, zlepšiť ich stabilitu a zacieliť ich len na sietnicu. Niektoré štúdie prinášajú sľubné výsledky čakajúce na zavedenie do praxe. Aktuálne používané nanočastice a ich účinok je zhrnutý v Fanguero a kol., 2015. Časom možno tieto technológie prinesú efektívny spôsob terapie, vďaka ktorému budú invazívne zákroky úplne eliminované.

Pri hľadaní účinných terapeutických prístupov môžu negatívne výsledky klinických štúdií spočívať v zaradení pacientov v pokročilých štádiách DR, pričom nové liečivá sú testované na animálnych modeloch s cieľom zabrániť rozvoju pokročilých štádií. Teda tieto testované liečivá nie sú účinné pri regresii existujúcich príznakov (Simó, Hernández, 2015). Z tohto dôvodu môže byť účinnosť terapeutík v klinickej štúdii skreslená a podcenená.

Pri navrhovaní nových terapeutických prístupov zameraných na konkrétne príznaky DR poskytuje multifaktoriálny charakter tohto ochorenia množstvo rôznych cieľov. Analýza kandidátnych génov, charakterizácia genetickej variability v celom spektre fenotypov DR, nájdenie polymorfizmov významne asociovaných s DR alebo priamo vplyvujúcich na funkciu zapojených génov napomôže hlbšiemu pochopeniu patogenézy diabetickej retinopatie. To by umožnilo vývoj efektívnejších terapií súčasne zacieleným na viacero procesov. Kombinácia viacerých inovatívnych terapeutických prístupov by mohla viesť k úspešnému výsledku, nakoľko existencia jediného univerzálneho lieku v prevencii vzniku a terapii DR zrejme nie je reálna.

8. ZÁVER

Diabetická retinopatia zostáva aj naďalej jedným z najkomplexnejších heterogénnych a multifaktoriálne podmienených ochorení, ktorým sa zaoberajú genetické štúdie. Celosvetovo je jednou z najčastejších príčin slepoty a poškodení zraku v civilizovaných krajinách. Liečebné možnosti sú značne obmedzené. Základné predpoklady pre spomalenie vzniku a priebehu ochorenia predstavujú: kontrola diabetu dodržiavaním normoglykémie, kontrola krvného tlaku a hladiny lipidov spolu s elimináciou oxidačného stresu. Oxidačný stres je významný rizikový faktor poškodenia mikrovaskulárneho riečiska a nadprodukcia reaktívnych kyslíkových radikálov v mitochondriách môže byť v pozadí viacerých patológií počas diabetickej retinopatie. V prípade nedodržania liečebných opatrení dochádza na sietnici k dlhodobým až nezvratným následkom. Z týchto dôvodov sa celosvetový výskum zameriava na pochopenie patofyziologických procesov prebiehajúcich v sietnici s cieľom predchádzať ochoreniu, hľadať nové spôsoby diagnostiky a liečby skorých reverzibilných štádií.

Výsledky štúdií a pozorovaní poukazujú na to, že na vzniku DR sa významne podieľajú aj genetické faktory. Tieto dôkazy pochádzajú z rôznych zdrojov. Na prvom mieste treba spomenúť, že u pacientov s rovnakým klinickým priebehom a kompenzáciou diabetu dochádza k rozvoju DR len u časti pacientov. Dokonca aj v prípade dĺžky trvania diabetu, jedného z najuznávanejších rizikových faktorov diabetickej retinopatie, sa u pacientov pozorovali významné rozdiely. U niektorých diabetikov sa ani po mnohých rokoch zle kompenzovaného diabetu nerozvinie retinopatia, kým u iných sa objavia príznaky DR už po krátkej dobe trvania kompenzovaného diabetu. Jediným vysvetlením tohto javu je odlišná genetická predispozícia pacientov s *diabetes mellitus*. V prospech genetických faktorov hovorí aj opakovaný výskyt DR v rodinách s pozitívnou anamnézou diabetu. Konkordancia výskytu diabetickej retinopatie u monozygotných dvojčiat je vyššia v porovnaní s dizygotnými. Najpresvedčivejšie dôkazy o úlohe genetiky pochádzajú priamo z väzbových analýz. Na druhom mieste treba spomenúť populačné rozdiely vo výskyte DR. Výrazné rozdiely sa našli medzi Afro-američanmi a Američanmi európskeho pôvodu, čo je spôsobené ich odlišnou genetickou výbavou v predispozícii na vznik retinopatie.

Všeobecne prevláda názor, že náchylnosť k vzniku DR je spôsobená veľkým množstvom relatívne bežných alelických variant s miernym účinkom. Záleží aj na spolupôsobení týchto alel, a v neposlednej rade aj na faktoroch vonkajšieho prostredia. Snahou je identifikovať lokusy zodpovedné za vznik DR. Každý DNA polymorfizmus má svoj podiel na zvýšení rizika vzniku diabetickej retinopatie. Ako kandidátne gény sa analyzovali predovšetkým gény kódujúce proteíny biochemických dráh. Napriek veľkému množstvu genetických analýz, animálnych modelov a štúdií nie sú k dispozícii jednoznačné výsledky a mnohé si dokonca protirečia. Pochopenie genetiky diabetickej retinopatie je otázkou budúcnosti, a preto stále existuje obrovský priestor pre klinikov a genetikov odhaliť podstatu tohto komplexného ochorenia. V oblasti genetiky sa objavujú viaceré výzvy, pretože tradičné a bežne používané prístupy zlyhávajú.

Pri navrhovaní terapeutických prístupov sa často zabúda na úlohu genetického pozadia ochorenia, čo môže byť jedným z neúspechov na tomto poli. Vďaka možnostiam, ktoré poskytujú nové technológie v oblasti molekulovej diagnostiky, predovšetkým sekvenovania novej generácie, dôjde pravdepodobne v blízkej budúcnosti k integrácii a prepojeniu výsledkov z rôznych odvetví, ktoré sú súčasťou genomiky, farmakogenomiky, transkriptomiky, proteomiky alebo metaboliky. Vytvorenie DNA banky s podrobnými anamnestickými, diagnostickými a laboratórnymi údajmi slovenských pacientov s diabeticou retinopatiou, bude excelentným a nenahradiiteľným prostriedkom pri výskume úlohy genetických faktorov v samotnej patogenéze tohto ochorenia. Pomocou novonadobudnutých poznatkov by sa mohlo podať navrhnuť a aplikovať do praxe spoľahlivé diagnostické postupy a efektívnejšiu terapiu so širokým záberom účinku. Budúcnosť dozaista prinesie prelomové objavy týkajúce sa diagnostiky tejto komplexnej a závažnej komplikácie diabetu postihujúcej ľudí v produktívnom veku.

9. ENGLISH SUMMARY

Diabetes mellitus is one of the most significant health problems worldwide. Diabetes is a metabolic disorder in which elevated blood sugar levels are present as a result of the inability to produce a sufficient amount of insulin (type 1) or as a result of cellular insulin resistance (type 2). Both types of diabetes are associated with hyperglycaemia, oxidative stress and inflammation. Progress in medicine has led to prolongation of diabetic patients' life but chronic complications of *diabetes mellitus* have become more frequent. These complications markedly decrease the quality of life and overall health condition of diabetics. Diabetic angiopathy is the most severe complication of *diabetes mellitus* and 75 % of diabetics die because of it. In regard to the type of the affected vasculature, two categories of angiopathy are known, microangiopathy and macroangiopathy. Coronary artery disease, atherosclerosis, hypertension and stroke belong to the complications caused by macroangiopathies.

Diabetic retinopathy is a common severe microangiopathy and complication of *diabetes mellitus* that can lead to blindness without proper medical treatment. Overall prevalence of diabetic retinopathy is 22–37% in individuals with the diagnosed diabetes. It is a degenerative disorder of retina and the most frequent cause of visual impairment and blindness among people in productive age worldwide alongside with macular oedema. Typical characteristics of the disease are a retinal microvascular damage as a result of prolonged exposure to metabolic changes induced by diabetes. First stage of diabetic retinopathy is a nonproliferative form of the disease for which hypoxic conditions, venous bleeding, microaneurysms, vascular leakage, hard exudates, intraretinal microvascular abnormalities and cotton wool spots are typical. When these complications induce neovascularization in retina, diabetic retinopathy progresses to advanced stage called proliferative diabetic retinopathy.

Diabetic retinopathy remains one of the most complex heterogeneous and multifactorial diseases which are objects of the genetic studies. Although the numerous experimental and clinical studies have been realised during the last decades, the aetiology of this complex disease still remains unclear and poorly understood. This is not surprising considering the multifactorial and complex character of diabetic retinopathy. The development of diabetic retinopathy is associated with environmental and genetic factors. One of the most significant risk factors is hyperglycaemia. Almost all patients with *diabetes mellitus* type 1 and

more than 60% of patients with *diabetes mellitus* type 2 are anticipated to have some type of retinopathy within the first ten years of the diagnosing the diabetes. However, it is not fully clarified how hyperglycaemia exactly causes the damage to the retinal microvasculature. In summary, hyperglycaemia leads to increased vascular permeability, haemostatic abnormalities, endothelial dysfunction, increased tissue ischemia, angiogenesis and neovascularization. In the case when hyperglycaemia is not strictly regulated, it can lead to irreversible structural and functional changes in vasculature and neural tissue of retina. Involvement of several biochemical pathways which can elucidate the role of hyperglycaemia in diabetic retinopathy pathophysiology has been proposed, including activation of diacyl-glycerol (DAG)-PKC pathway, accelerated formation of advanced glycation endproducts (AGE), increased polyol pathway flux, increased expression of growth factors (VEGF, IGF-1), haemodynamic changes, renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), leukostasis, subclinical inflammation, and oxidative stress that leads to increased expression of several proinflammatory genes (NF- κ B, TGF- β , NOX4, Nrf2, etc.). Genetic studies are mainly focused on members of these signaling and biochemical pathways. Other contributors to the risk of development of diabetic retinopathy are dyslipidemia and high blood pressure.

Diagnostic methods of diabetic retinopathy in clinical practice include ophthalmoscopy, optical coherent tomography, retinal photography and fluorescent angiography. Main purpose of these methods is a detection of structural changes in retina.

Therapeutic possibilities are limited and are primarily focused on systemic management of the disease. Strict control of hyperglycaemia, hypertension and lipidemia alongside with elimination of oxidative stress is the main precondition for inhibition of diabetic retinopathy progression. The aim of the therapies is to compensate *diabetes mellitus*. Pharmacotherapies attenuate symptoms of diabetic retinopathy but they are applied after development of pathological changes in retina when the diabetic retinopathy is in advanced stages. Laser photocoagulation, injection of corticosteroids into the vitreous body for reduction of inflammation, anti-VEGF therapies and vitreo-retinal surgeries are the most usually used therapies. The retina undergoes lifelong irreversible damage in the case of neglected preventive measures.

Research in the field of diabetic retinopathy is focused on understanding how the pathophysiological processes in retina are initiated and its goals are to find ways how to

prevent retinopathy formation and appropriately detect early its stages before severe retinal damage.

Genetic predispositions to diabetic retinopathy or some aspects of diabetic retinopathy pathophysiology are unknown. There are several types of genetic studies such as family studies, linkage studies, candidate gene studies or genome-wide association studies that are based on different approaches. It is common, that patients with the same control of hyperglycaemia, duration of diabetes and other risk factors could have diametrically different consequences of diabetic retinopathy which can be explained by their different genetic make-up. Recurrent incidence of diabetic retinopathy in family history is also in favour of genetic contribution to development of diabetic retinopathy. Concordance of diabetic retinopathy in monozygotic twins is higher than in case of dizygotic twins. Although genetic studies are using distinct methods, their conclusions for diabetic retinopathy are in general the same – diabetic retinopathy has definitely a genetic background but from the results of studies it is not possible to pinpoint the risk locus or DNA variants that are responsible for susceptibility to diabetic retinopathy.

Screening, monitoring, accurate diagnostics and prevention are essential steps in elimination of the adverse diabetic retinopathy effects reducing the quality of diabetics' life. Hence the recognition of genetic predisposition would be a great addition/contribution to identification and diagnostics of high risk patients. Despite of the great amount of knowledge about diabetic retinopathy, the exact mechanisms of each aspect of diabetic retinopathy pathophysiology need to be elucidated. There is a common consensus that the susceptibility to diabetic retinopathy is contingent upon a great amount of relatively common allelic variants with a modest effect, and the ways by which these genes interact among themselves and with environmental influences. Each of the allelic variants increases the risk of diabetic retinopathy by a small portion in overall susceptibility. That is the reason why identification of genes significantly associated with diabetic retinopathy is complicated and why findings of genetic studies are inconclusive and contradictory. In recent years, new approaches, technical possibilities and methods in different omics (genomics, proteomics, metabolomics, etc...) enable to connect findings from different fields of study and disclose other unexplained traits of diabetic retinopathy, especially in the field of genetics, thanks to next generation sequencing methods that can produce enormous amount of data for lower costs.

The ultimate goal of genetic studies is the identification of a specific marker or possibly several markers associated with the development of diabetic retinopathy. This kind of marker would allow capturing patients at risk even before the first subclinical structural changes appear in retina that would lead to optimal prevention, precise prediction of disease progress and attenuation of lifelong health consequences of the disease.

The purpose of this book is to comprehensively summarize up-to-date information and knowledge about diabetic retinopathy gained through genetic studies. The book is aimed mainly for clinicians and researchers that deal with this complex disease or others interested in genetics of diabetic retinopathy. Our monograph should provide basic knowledge about pathophysiological processes during diabetic retinopathy and about the role of particular genes that have been objects of genetic studies in diabetic retinopathy. In our work we focused on the candidate gene studies. Candidate gene studies compare the frequency of a particular genetic variant in subjects with or without diabetic retinopathy. Findings about pathophysiology of diabetic retinopathy allow proposing possible candidate genes, which could play a role in the development and progression of diabetic retinopathy. Our aim is to interconnect researchers and clinicians, and to initiate multidisciplinary discussion about more integrated approach towards diabetic retinopathy. We would like to motivate to search for new innovative approaches for full explanation of diabetic retinopathy aspects. Purpose of the effort is to improve not only diagnostics, but also therapeutic possibilities. Explanation of the background of diabetic retinopathy and mainly application of these findings would also lead to designing new effective therapies. Often genetics is neglected during validation of effectiveness of specific therapy which could be one of the reasons of setbacks in this field of research. Implementation of more integrated approach to diabetic retinopathy that will include genetic background of the disease can lead to innovative personalized therapies with higher effectivity.

10. LITERATÚRA

Abcouwer SF. Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy. *J Clin Cell Immunol.* 2013;Suppl 1(11):10-11. doi:10.4172/2155-9899.

Abhary S, Abhary S, Burdon KP, a kol. Association between erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(1):102-106. doi:10.1001/archophthalmol.2009.355.

Abhary S, Burdon KP, Gupta A, a kol. Common sequence variation in the VEGFA gene predicts risk of diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(12):5552-5558. doi:10.1167/iovs.09-3694.

Abhary S, Burdon KP, Laurie KJ, Thorpe S, Landers J, Goold L, a kol. Aldose reductase gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility. *Diabetes care.* 2010;33(8):1834-1836. doi:10.2337/dc09-1893.

Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. A Systematic Meta-Analysis of Genetic Association Studies for Diabetic Retinopathy Supplementary_Table_1A_and_B. 2009;58(September):2137-2147. doi:10.2337/db09-0059.

Aiello LP. Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2005;353:839-841. doi:10.1056/NEJMe058142.

Al-Halafi AM. Nanocarriers of nanotechnology in retinal diseases. *Saudi J Ophthalmol.* 2014;28(4):304-309. doi:10.1016/j.sjopt.2014.02.009.

Amano S, Yamagishi SI, Koda Y, a kol. Polymorphisms of sorbitol dehydrogenase (SDH) gene and susceptibility to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses.* 2003;60(4):550-551. doi:10.1016/S0306-9877(03)00013-6.

Arar NH, Freedman BI, Adler SG, a kol. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: The FIND-Eye study. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(9):3839-3845. doi:10.1167/iovs.07-1633.

Awata T, Inoue K, Kurihara S, a kol. A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated

Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002;51:1635-1639.

Awata T, Kurihara S, Takata N, a kol. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333(3):679-685. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.167.

Awata T, Yamashita H, Kurihara S, a kol. A genome-wide association study for diabetic retinopathy in a Japanese population: Potential association with a long intergenic non-coding RNA. *PLoS One*. 2014;9(11). doi:10.1371/journal.pone.0111715.

Balasubbu S, Sundaresan P, Rajendran A, a kol. Association analysis of nine candidate gene polymorphisms in Indian patients with type 2 diabetic retinopathy. *BMC Med Genet*. 2010;11(1):158. doi:10.1186/1471-2350-11-158.

Bandello F, Preziosa C, Querques G, Lattanzio R. Update of intravitreal steroids for the treatment of diabetic macular edema. *Ophthalmic Res*. 2014;52(2):89-96. doi:10.1159/000362764.

Bansal D, Badhan Y, Gudala K, Schifano F. Ruboxistaurin for the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a systematic review of randomized clinical trials. *Diabetes Metab J*. 2013;37(5):375-384. doi:10.4093/dmj.2013.37.5.375.

Barba I, Garcia-Ramírez M, Hernández C, a kol. Metabolic fingerprints of proliferative diabetic retinopathy: An ¹H-NMR-based metabolomic approach using vitreous humor. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(9):4416-4421. doi:10.1167/iov.10-5348.

Barnett PA, González RG, Chylack LT, Cheng H-M. The Effect of Oxidation on Sorbitol Pathway Kinetics. *Diabetes*. 1986;35(4):426-432; doi: 10.2337/diab.35.4.426.

Bazzaz JT, Amoli MM, Pravica V, a kol. eNOS gene polymorphism association with retinopathy in type 1 diabetes. *Ophthalmic Genet*. 2010;31(3):103-107. doi:10.3109/13816810.2010.482553.

Behl T, Kotwani A. Possible role of endostatin in the antiangiogenic therapy of diabetic retinopathy. *Life Sci*. 2015;135:131-137. doi:10.1016/j.lfs.2015.06.017.

Beige J, Bellmann A, Sharma AM, Geßner R. Ethnic origin determines the impact of genetic variants in dopamine receptor gene (DRD1) concerning essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17(12):1184-1187. doi:10.1016/j.amjhyper.2004.07.013.

Beranek M, Kankova K, Benes P, a kol. Polymorphism R25P in the gene encoding transforming growth factor-beta (TGF-beta1) is a newly identified risk factor for proliferative diabetic retinopathy. *Am J Med Genet*. 2002;109(4):278-283. doi:10.1002/ajmg.10372.

Beranek M, Kolar P, Tschoplova S, Kankova K, Vasku A. Genetic variation and plasma level of the basic fibroblast growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;79(2):362-367. doi:10.1016/j.diabres.2007.09.012.

Boemi M, Sirolla C, Amadio L, Fumelli P, James RW. Lipoprotein(a) and retinopathy in IDDM and NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1997;20(1):115.

Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, a kol. Hyperglycemia Induces a Dynamic Cooperativity of. 2009;58(May):1229-1236. doi:10.2337/db08-1666.

Brondani LA, de Souza BM, Duarte GCK, a kol. The UCP1 -3826A/G polymorphism is associated with diabetic retinopathy and increased UCP1 and MnSOD2 gene expression in human retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(12):7449-7457. doi:10.1167/iov.12-10660.

Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Tarach J, Ksiazek A. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol*. 2009;70(2):121-124. doi:10.1016/j.humimm.2008.12.003.

Buraczynska M, Ksiazek P, Baranowicz-Gaszczyk I, Jozwiak L. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(3):827-832. doi:10.1093/ndt/gfl641.

Burditt AG, Caird FI, Draper GJ. The natural history of diabetic retinopathy. *Q J Med.* 1968;37(146):303–317.

Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye.* 2002;16(3):242–260. doi:10.1038/sj/eye/6700133.

Calcutt NA, Cooper ME, Kern TS, Schmidt AM. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(5):417–429. doi:nrd2476 [pii]v10.1038/nrd2476.

Carrasco E, Hernández C, Miralles A, Huguet P, Farrés J, Simó R. Lower Somatostatin Expression Is an Early Event in Diabetic Retinopathy and Is. 2007;30(11). doi:10.2337/dc07-0332.Additional.

Cerani A, Tetreault N, Menard C, a kol. Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab.* 2013;18(4):505–518. doi:10.1016/j.cmet.2013.09.003.

Chang YC, Wu WC. Dyslipidemia and diabetic retinopathy. *Rev Diabet Stud.* 2013;10(2-3):121–132. doi:10.1900/RDS.2013.10.121.

Chaturvedi N, Porta M, Klein R, a kol. Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials. *Lancet.* 2008;372(9647):1394–1402. doi:10.1016/S0140-6736(08)61412-9.

Cheema BS, Kohli HS, Sharma R, Bhansali A, Khullar M. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and type 2 diabetic retinopathy among Asian Indians. *Acta Diabetol.* 2012;49(6):481–488. doi:10.1007/s00592-012-0437-7.

Chen M, Lin WR, Lu CH, a kol. Chimerin 2 genetic polymorphisms are associated with non-proliferative diabetic retinopathy in Taiwanese type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 2014;28(4):460–463. doi:10.1016/j.jdiacomp.2014.04.009.

Chen Y, Huang H, Zhou JM, Doumatey A, Lashley K, Chen G, a kol. Polymorphism of the

endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic retinopathy in a cohort of West Africans. *Mol Vis.* 2007;26(13):2142–2147.

Chew EY, Ambrosius WT, Davis MD, Danis RP, Gangaputra S, Greven CM, a kol. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2010;363(3):233–244. doi: 10.1056/NEJMoa1001288.

Cho H, Sobrin L. Genetics of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2014;14:515.

Chun M-Y, Hwang H-S, Cho H-Y, a kol. Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with nonproliferative and proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3547–3551. doi:10.1210/jc.2009-2719.

Churchill AJ, Carter JG, Ramsden C, a kol. VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(8):3611–3616. doi:10.1167/iovs.07-1383.

Ciccacci C, Di Fusco D, Cacciotti L, a kol. TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: Association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Acta Diabetol.* 2013;50(5):789–799. doi:10.1007/s00592-012-0418-x.

Cilenšek I, Mankoč S, Petrovič MG, Petrovič D. GSTT1 null genotype is a risk factor for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes, whereas GSTM1 null genotype might confer protection against retinopathy. *Dis Markers.* 2012;32(2):93–99. doi:10.3233/DMA-2011-0863.

Cilenšek I, Mankoč S, Petrovič MG, Petrovič D. The 4a/4a genotype of the VNTR polymorphism for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene predicts risk for proliferative diabetic retinopathy in Slovenian patients (Caucasians) with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep.* 2012;39(6):7061–7067. doi:10.1007/s11033-012-1537-8.

Cosentino C, Mostoslavsky R. Metabolism, longevity and epigenetics. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(9):1525–1541. doi:10.1007/s00018-013-1295-3.

Crispim D, Fagundes NJR, Dos Santos KG, a kol. Polymorphisms of the UCP2 gene are associated with proliferative diabetic retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(5):612-619. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03684.x.

Cunha-Vaz J. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy. Personalized medicine for diabetic retinopathy: the Weisenfeld award. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(8):5412-5419. doi:10.1167/iov.14-14884.

Cyganek K, Mirkiewicz-Sieradzka B, Malecki MT, a kol. Clinical risk factors and the role of VDR gene polymorphisms in diabetic retinopathy in Polish type 2 diabetes patients. *Acta Diabetol*. 2006;43(4):114-119. doi:10.1007/s00592-006-0225-3.

Dal S, Sigrist S. The Protective Effect of Antioxidants Consumption on Diabetes and Vascular Complications. *Diseases*. 2016;4(3):24. doi:10.3390/diseases4030024.

Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: Pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(6):721-748. doi:10.1016/j.preteyeres.2003.08.001.

Declèves A-E, Sharma K. New pharmacological treatments for improving renal outcomes in diabetes. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(6):371-380. doi:10.1038/nrneph.2010.57.

Demiryurek AT, Erbagci I, Oztuzcu S, a kol. Lack of association between the Thr431Asn and Arg83Lys polymorphisms of the ROCK2 gene and diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 2010;35(12):1128-1134. doi:10.3109/02713683.2010.507903.

Ding Y, Hu Z, Yuan S, Xie P, Liu Q. Association between transcription factor 7-like 2 rs7903146 polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Diab Vasc Dis Res*. 2015;12(6):436-444. doi:10.1177/1479164115598274.

Dong H, Li Q, Wang M, Wan G. Association Between IL-10 Gene Polymorphism and Diabetic Retinopathy. *Med Sci Monit*. 2015;21:3203-3208. doi:10.12659/MSM.894371.

Dong L, Iv XY, Wang BJ, a kol. Association of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)2518A/G polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in northern Chinese type

2 diabetes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(12):1921-1926. doi:10.1007/s00417-014-2651-1.

Donnelly R, Idris I, Forrester J V. Protein kinase C inhibition and diabetic retinopathy: a shot in the dark at translational research. *Br J Ophthalmol*. 2004;88:145-151. doi:10.1136/bjo.88.1.145.

Doria A. Genetics of Diabetes Complications. *Curr Diab Rep*. 2010;10(6):467-475. doi:10.1007/s11892-010-0147-x.

El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, a kol. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008;205(10):2409-2417. doi:10.1084/jem.20081188.

Fagan XJ, Chong EW. Fenofibrate and diabetic retinopathy. *Clin Exp Ophthalmol*. 2015;43(4):297-299. doi:10.1111/ceo.12539.

Fangueiro JF, Gonzalez-Mira E, Martins-Lopes P, a kol. A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: production, characterization and toxicity testing. *Pharm Dev Technol*. 2013;18(3):545-549. doi:10.3109/10837450.2011.591804.

Fangueiro JF, Silva AM, Garcia ML, Souto EB. Current nanotechnology approaches for the treatment and management of diabetic retinopathy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;95:307-322. doi:10.1016/j.ejpb.2014.12.023.

Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: Life style intervention. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/801896.

Ferreira FN, Crispim D, Canani LH, Gross JL, Dos Santos KG. Association study of sorbitol dehydrogenase -888G>C polymorphism with type 2 diabetic retinopathy in Caucasian-Brazilians. *Exp Eye Res*. 2013;115:140-143. doi:10.1016/j.exer.2013.06.027.

Fong DS, Iii FLF, Davis MD, a kol. Causes of Severe Visual Loss in the Early Reading. 1999;(24):137-141.

Forneris F, Binda C, Battaglioli E, Mattevi A. LSD1: oxidative chemistry for multifaceted functions in chromatin regulation. *Trends Biochem Sci*. 2008;33(4):181-189. doi:10.1016/j.tibs.2008.01.003.

Fu Y-P, Hallman DM, Gonzalez VH, a kol. Identification of Diabetic Retinopathy Genes through a Genome-Wide Association Study among Mexican-Americans from Starr County, Texas. *J Ophthalmol*. 2010;2010. doi:10.1155/2010/861291.

Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, a kol. Length rather than a specific allele of dinucleotide repeat in the 5' upstream region of the aldose reductase gene is associated with diabetic retinopathy. 1999:1044-1047.

Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(3):311-315.

Gašperíková D, Tribble ND, Staník J, a kol. Identification of a Novel β -Cell Glucokinase (GCK) Promoter Mutation (-71G>C) That Modulates GCK Gene Expression Through Loss of Allele-Specific Sp1 Binding Causing Mild Fasting Hyperglycemia in Humans. *Diabetes*. 2009;58(8):1929-1935. doi:10.2337/db09-0070

Ghanem AA, Elewa A, Arafa LF. Pentosidine and N-carboxymethyl-lysine: biomarkers for type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol*. 2011; 21(1): 48-54.

Giorgi C, Agnoletto C, Baldini C, a kol. Redox Control of Protein Kinase C: Cell- and Disease-Specific Aspects. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(7):1051-1085. doi:10.1089/ars.2009.2825.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854.

Gong JY, Sun YH. Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy: A meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(12). doi:10.1371/journal.pone.0084069.

Goto H, Nishikawa T, Sonoda K, a kol. Endothelial MnSOD overexpression prevents retinal VEGF expression in diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(3):814-820. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.041.

Gragnoli C. Proteasome modulator 9 is linked to microvascular pathology of T2D. *J Cell Physiol*. 2012;227(8):3116-3118. doi:10.1002/jcp.23063.

Grant MB, Boulton ME, Ljubimov A V. Erythropoietin: When liability becomes asset in neurovascular repair. *J Clin Invest*. 2008;118(2):467-470. doi:10.1172/JCI34643.

Grassi MA, Tikhomirov A, Ramalingam S, Below JE, Cox NJ, Nicolae DL. Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy. *Hum Mol Genet*. 2011;20(12):2472-2481. doi:10.1093/hmg/ddr121.

Grassi MA, Tikhomirov A, Ramalingam S, a kol. Replication Analysis for Severe Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(4):2377-2381. doi:10.1167/iovs.11-8068. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Int J Epidemiol*. 2013;42(5):1215-1222. doi:10.1093/ije/dyt133.

Hernández C, Segura RM, Fonollosa A, Carrasco E, Francisco G, Simó R. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med*. 2005;22(6):719-722. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01538.x.

Hong YJ, Kang ES, Ji MJ, a kol. Association between Bsm1 Polymorphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea)*. 2015;30(4):469-474. doi:10.3803/EnM.2015.30.4.469.

Hosseini SM, Boright AP, Sun L, a kol. The association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta-analysis of diabetic retinopathy. *Hum Genet*. 2015;134(2):247-257. doi:10.1007/s00439-014-1517-2.

Hove MN, Kristensen JK, Lauritzen T, Bek T. The relationships between risk factors and the distribution of retinopathy lesions in type 2 diabetes. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006;84(5):619-623. doi:10.1111/j.1600-0420.2006.00710.x.

Hsieh CH, Pei D, Hung YJ, Hsiao FC. Association between retinoid-X receptor-gamma genetic polymorphisms and diabetic retinopathy. *Genet Mol Res*. 2011;10(4):3545-3551. doi:10.4238/2011.December.5.4.

Hu A, Luo Y, Li T, a kol. Low serum apolipoprotein A1/B ratio is associated with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2012;250(7):957-962. doi:10.1007/s00417-011-1855-x.

Hu C, Zhang R, Yu W, a kol. CPVL/CHN2 genetic variant is associated with diabetic retinopathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2011;60(11):3085-3089. doi:10.2337/db11-0028.

Huang L, Zhang R, Wu J, a kol. Increased susceptibility to acute kidney injury due to endoplasmic reticulum stress in mice lacking tumor necrosis factor- β and its receptor 1. *Kidney Int*. 2011;79(6):613-623. doi:10.1038/ki.2010.469.

Huang L, Zhang R, Wu J, a kol. Increased susceptibility to acute kidney injury due to endoplasmic reticulum stress in mice lacking tumor necrosis factor- β and its receptor 1. *Kidney Int*. 2011;79(6):613-623. doi:10.1038/ki.2010.469.

Huang Y-C, Lin J-M, Lin H-J, a kol. Genome-wide association study of diabetic retinopathy in a Taiwanese population. *Ophthalmology*. 2011;118(4):642-648. doi:10.1016/j.optha.2010.07.020.

Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2001;50(6):1505-1511. doi:10.2337/diabetes.50.6.1505.

Chai D, Wang B, Shen L, Pu J, Zhang XK, He B. RXR agonists inhibit high-glucose-induced oxidative stress by repressing PKC activity in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(7):1334-1347. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.022.

Ichikawa F, Yamada K, Ishiyama-Shigemoto S, Yuan X, Nonaka K. Association of an (A-C)_n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5'-region of the aldose reductase gene with

retinopathy but not with nephropathy or neuropathy in Japanese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1999;16(9):744-748. doi:10.1046/j.1464-5491.1999.00155.x. Ikegishi Y, Tawata M, Aida K, Onaya T. Z-4 allele upstream of the aldose reductase gene is associated with proliferative retinopathy in Japanese patients with NIDDM, and elevated luciferase gene transcription in vitro. *Life Sci*. 1999;65(20):2061-2070.

Jaé N, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs in Diabetic Retinopathy. 2015:1104-1106. doi:10.1038/nrg3074.2.

Jarrett SG, Lin H, Godley BF, Boulton ME. Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2008;27(6):596-607. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.09.001.

Jensen RA, Sim X, Li X, a kol. Genome-Wide Association Study of Retinopathy in Individuals without Diabetes. *PLoS One*. 2013;8(2). doi:10.1371/journal.pone.0054232.

Jeon HJ, Choi HJ, Park BH, Lee YH, Oh T. Association of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 2518A/G polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in Korean type 2 diabetes. *Yonsei Med J*. 2013;54(3):621-625. doi:10.3349/ymj.2013.54.3.621.

Jiang J, Huang L, Yu W, Wu X, Zhou P, Li X. Overexpression of HTRA1 Leads to Down-Regulation of Fibronectin and Functional Changes in RF/6A Cells and HUVECs. *PLoS One*. 2012;7(10):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0046115.

Jiang Y, Pagadala J, Miller D, Steinle JJ. Reduced insulin receptor signaling in retinal Müller cells cultured in high glucose. *Mol Vis*. 2013;19(October 2012):804-811.

JiXiong X, BiLin X, MingGong Y, ShuQin L. -429T/C and -374T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2696-2697.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484-492. doi:10.1038/nrg3230.

Joussen AM, Poulaki V, Tsujikawa A, a kol. Suppression of diabetic retinopathy with an-

giopietin-1. *Am J Pathol.* 2002;160(5):1683-1693. doi:10.1016/S0002-9440(10)61115-7. Joyal JS, Sitaras N, Binet F, a kol. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood.* 2011;117(22):6024-6035. doi:10.1182/blood-2010-10-311589.

Kadiyala CSR, Zheng L, Du Y, a kol. Acetylation of retinal histones in diabetes increases inflammatory proteins: Effects of minocycline and manipulation of histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC). *J Biol Chem.* 2012;287(31):25869-25880. doi:10.1074/jbc.M112.375204.

Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(5):1061-1068.

Kangas-Kontio T, Vavuli S, Kakko SJ, a kol. Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(10):1401-1406. doi:10.1136/bjo.2009.159012. Kankova K, Muzik J, Karaskova J, a kol. Duration of non-Insulin-dependent diabetes mellitus and the TNF-beta NcoI genotype as predictive factors in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica.* 2001;215(4):294-298. doi:50877.

Katakami N, Kaneto H, Takahara M, a kol. Aldose reductase C-106T gene polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92(3):57-60. doi:10.1016/j.diabres.2011.02.017.

Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, a kol. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism as a potential risk factor for diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;89(1):e9-12. doi:10.1016/j.diabres.2010.04.006.

Kato M, Castro NE, Natarajan R. MicroRNAs: Potential mediators and biomarkers of diabetic complications. *Free Radic Biol Med.* 2013;64:85-94. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.009.

Kim I, Ryan AM, Rohan R, a kol. in *Normal Eyes.* Invest Ophthalmol. 2016.

Kinoshita JH. A thirty year journey in the polyol pathway. *Exp Eye Res.* 1990;50(6):567-573. doi:10.1016/0014-4835(90)90096-D.

Klein R, Klein BEK, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:1217-1228.

Klein R, Klein BEK, Moss SE. Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 1992;15(12):1875-1891.

Klein R, Lee KE, Gangnon RE, Klein BE. The 25-year incidence of visual impairment in type 1 diabetes mellitus the wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmol.* 2010;117(1):63-70.

Ko BC, Lam KS, Wat NM, Chung SS. Patients. 1995;19:727-732.

Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, Xu S. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4402-4409. doi:10.1167/iov.10-6879.

Kowiuru RA, Jirousek MR, Stramm L, Farid N, Engerman RL, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia: V. Relationship between protein kinase C and APTases. *Diabetes.* 1998;47(3):464-469. doi:10.2337/diabetes.47.3.464. Kowluru RA, Chan P-S. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007:43603. doi:10.1155/2007/43603.

Kritzik M, Savage B. Nucleotide polymorphisms in the $\alpha 2$ gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet $\alpha 2\beta 1$ density. *Blood.* 1998;92(7):2382-2388.

Kumaramanickavel G, Ramprasad VL, Sriprya S, Upadyay NK, Paul PG, Sharma T. Association of Gly82Ser polymorphism in the RAGE gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients. *J Diabetes Complications.* 2002;16(6):391-394. doi:10.1016/S1056-8727(02)00187-3.

Kumaramanickavel G, Sripriya S, Vellanki RN, a kol. Tumor necrosis factor allelic polymorphism with diabetic retinopathy in India. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;54(2):89-94. doi:10.1016/S0168-8227(01)00269-8.

Kuo JZ, Wong TY, Rotter JL. Challenges in Elucidating the Genetics of Diabetic Retinopathy. *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(1):96-107. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.5024.

Kusari J, Zhou S, Padillo E, Clarke KG, Gil DW. Effect of memantine on neuroretinal function and retinal vascular changes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(11):5152-5159. doi:10.1167/iov.07-0427.

Kusari J, Zhou SX, Padillo E, Clarke KG, Gil DW. Inhibition of vitreoretinal VEGF elevation and blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-induced diabetic rats by brimonidine. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(2):1044-1051. doi:10.1167/iov.08-3293.

Kwak SH, Park KS. Genetic Studies on Diabetic Microvascular Complications: Focusing on Genome-Wide Association Studies. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea).* 2015;30(2):147-158. doi:10.3803/EnM.2015.30.2.147.

Lee D, Shin C. MicroRNA-target interactions: New insights from genome-wide approaches. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1271(1):118-128. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06745.x.

Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vis (London, England).* 2015;2:17. doi:10.1186/s40662-015-0026-2.

Lee SC, Wang Y, Ko GT, a kol. Association of retinopathy with a microsatellite at 5' end of the aldose reductase gene in Chinese patients with late-onset Type 2 diabetes. *Ophthalmic Genet.* 2001;22(2):63-67. doi:10.1076/opge.22.2.63.2230.

Leitão CB, Nabinger GB, Krahe AL, a kol. The role of K121Q ENPP1 polymorphism in diabetes mellitus and its complications. *Brazilian J Med Biol Res.* 2008;41(3):229-234. doi:10.1590/S0100-879X2006005000202.

Leslie RD, Pyke DA. Diabetic retinopathy in identical twins. *Diabetes.* 1982;31(1):19-21. Li H, Louey JWC, Choy KW, a kol. EDN1 Lys198Asn is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Mol Vis.* 2008;14(September):1698-1704.

Li X, Luo X, Lu X, Duan J, Xu G. Metabolomics study of diabetic retinopathy using gas chromatography-mass spectrometry: a comparison of stages and subtypes diagnosed by Western and Chinese medicine. *Mol Biosyst.* 2011;7(7):2228-2237. doi:10.1039/c0mb00341g.

Liang S, Pan M, Hu N, a kol. Association of angiotensin-converting enzyme gene 2350 G/A polymorphism with diabetic retinopathy in Chinese Han population. *Mol Biol Rep.* 2013;40(1):463-468. doi:10.1007/s11033-012-2081-2.

Liew G, Klein R, Wong TY. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin.* 2009;49(2):35-52. doi:10.1097/IIO.0b013e31819fd5d7.

Liew G, Shankar A, Wang JJ, a kol. Apolipoprotein E Gene Polymorphisms Are Not Associated With Diabetic Retinopathy: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Ophthalmol.* 2006;142(1):105-111. doi:10.1016/j.ajo.2006.02.054.

Lim LS, Wong TY. Lipids and diabetic retinopathy. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(1):93-105. doi:10.1517/14712598.2012.641531.

Lindholm E, Bakhtadze E, Sjögren M, a kol. The -374 T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia.* 2006;49(11):2745-2755. doi:10.1007/s00125-006-0412-3.

Liu L, Jiao J, Wang Y, a kol. TGF-beta1 gene polymorphism in association with diabetic retinopathy susceptibility: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0094160.

Liu L, Yu Q, Wang H, Zhang SX, Huang C, Chen X. Association of intercellular adhesion molecule 1 polymorphisms with retinopathy in Chinese patients with Type 2 diabetes. 2006:643-648.

Looker HC, Nelson RG, Chew E, a kol. Genome-wide linkage analyses to identify loci for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2007;56(4):1160-1166. doi:10.2337/db06-1299.

Lopes de Faria JB, Silva KC, Lopes de Faria JM. The contribution of hypertension to diabetic nephropathy and retinopathy: the role of inflammation and oxidative stress. *Hypertens Res*. 2011;34(January):413-422. doi:10.1038/hr.2010.263.

Lu Y, Ge Y, Hu Q, a kol. Association between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and diabetic retinopathy in the Chinese population. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst*. 2012;13(2):289-295. doi:10.1177/1470320311432187.

Luo J, Zhao L, Chen AY, a kol. TCF7L2 variation and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2013;62(7):2613-2617. doi:10.2337/db12-1093.

Lv Z, Li Y, Wu Y, Qu Y. Association of ICAM-1 and HMGA1 Gene Variants with Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus Among Chinese Individuals. *Curr Eye Res*. 2015;3683(December):1-5. doi:10.3109/02713683.2015.1094093.

Madsen-Bouterse SA, Zhong Q, Mohammad G, HO Y-S, Kowluru RA. Oxidative damage of mitochondrial DNA in diabetes and its protection by manganese superoxide dismutase. *Free radic res*. 2010;44(3):313-321. doi:10.3109/10715760903494168.

Mahoney SE, Loprinzi PD. Influence of flavonoid-rich fruit and vegetable intake on diabetic retinopathy and diabetes-related biomarkers. *J Diabetes Complications*. 2014;28(6):767-771. doi:10.1016/j.jdiacomp.2014.06.011.

Maioli M, Tonolo G, Pacifico A, a kol. Raised serum apolipoprotein (a) in active diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 1993;36(1):88-90. doi:10.1007/BF00399100.

Mason JO, Colagross CT, Vail R. Diabetic vitrectomy: risks, prognosis, future trends. *Curr Opin Ophthalmol*. 2006;17(3):281-285. doi:10.1097/01.icu.0000193098.28798.18.

Matakova T, Sivonova M, Halasova E, Mistuna D, Dzian A, Berzinec P, a kol Gene polymorphisms of biotransforming enzymes (GSTs) and their association with lung cancer in the

Slovakian population. *Eur J Med Res*; 2009; Suppl 4:275-9.

Matsubara Y, Murata M, Maruyama T, a kol. Association between diabetic retinopathy and genetic variations in alpha2beta1 integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood*. 2000;95(5):1560-1564.

Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Kohner EM. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(11):1631-1640. doi:10.1001/archophth.122.11.1631.

Mazzio EA, Soliman KFA. Basic concepts of epigenetics impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*. 2012;7(2):119-130. doi:0.4161/epi.7.2.18764.

Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA*.2009;298(8):902-916.

Morita K, Saruwatari J, Miyagawa H, a kol. Association between aldehyde dehydrogenase 2 polymorphisms and the incidence of diabetic retinopathy among Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):132. doi:10.1186/1475-2840-12-132.

Mustata GT, Rosca M, Biemel KM, a kol. Paradoxical Effects of Green Tea (Camellia Sinensis). 2005;54(February):517-526.

Mutombo PB, Yamasaki M, Shiwaku K. UCP2 I/D Modulated Change in BMI During a Lifestyle Modification Intervention Study in Japanese Subjects. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17(1):16-20. doi:10.1089/gtmb.2012.0229.

Nagi DK, McCormack LJ, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Knowler WC, Grant PJ. Diabetic retinopathy, promoter (4G/5G) polymorphism of PAI-1 gene, and PAI-1 activity in Pima Indians with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 1997;20(8):1304-1309.

Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*

mol. 2009;247(1):21-26. doi:10.1007/s00417-008-0915-3.

Nakanishi K, Watanabe C. Single nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene intron 2 are markers for early progression of diabetic retinopathy in Japanese with type 1 diabetes. Clin Chim Acta. 2009;402(1-2):171-175. doi:10.1016/j.cca.2009.01.004.

Newman DK. Surgical management of the late complications of proliferative diabetic retinopathy. Eye. 2010;24(3):441-449. doi:10.1038/eye.2009.325.

Ng DPK. Human genetics of diabetic retinopathy: current perspectives. J Ophthalmol. 2010;2010(Table 1). doi:10.1155/2010/172593.

Ng YK, Zeng XX, Ling EA. Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. Brain Res. 2004;1018(1):66-72. doi:10.1016/j.brainres.2004.05.055.

Ng ZX, Kuppusamy UR, Poh R, a kol. Lack of association between Gly82Ser, 1704G/T and 2184A/G of RAGE gene polymorphisms and retinopathy susceptibility in Malaysian diabetic patients. Genet Mol Res. 2012;11(1):455-461. doi:10.4238/2012.March.1.2.

Ng ZX, Kuppusamy UR, Tajunisah I, Fong KCS, Chua KH. Investigation of SLC2A1 26177A/G gene polymorphism via high resolution melting curve analysis in Malaysian patients with diabetic retinopathy. J Diabetes Complications. 2012;26(5):388-392. doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.05.014.

Nikzamir A, Rashidi A, Esteghamati A, Nakhjavani M, Golmohammadi T, Khalilzadeh O. The relationship between ACE gene insertion/deletion polymorphism and diabetic retinopathy in Iranian patients with type 2 diabetes. Ophthalmic Genet. 2010;31(3):108-113. doi:10.3109/13816810.2010.482554.

Nishimura DY, Fath M, Mullins RF, a kol. Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(47):16588-16593. doi:10.1073/pnas.0405496101.

Niskanen L, Voutilainen-Kaunisto R, Teräsvirta M, Karvonen MK, Valve R, Pesonen U, Laakso M, Uusitupa MI, Koulu M. Leucine 7 to proline 7 polymorphism in the neuropeptide y gene is associated with retinopathy in type 2 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2000;108(3):235-236.

Nordwall M, Abrahamsson M, Dhir M, Fredrikson M, Ludvigsson J, Arnqvist HJ. Impact of HbA1c, followed from onset of type 1 diabetes, on the development of severe retinopathy and nephropathy: The viss study (vascular diabetic complications in Southeast Sweden). Diabetes Care. 2015;38(2):308-315. doi:10.2337/dc14-1203.

Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. Drug Metab Rev. 2012;43(2):138-151. doi:10.3109/03602532.2011.558093.

Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li A, Sato T, Roy S. Effect of Combined Antisense Oligonucleotides Against Vascular Permeability. Image (Rochester, NY). 2006;55(January).

Paine SK, Sen A, Choudhuri S, a kol. Association of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, and interleukin 10 promoter polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic subjects. Retina. 2012;32(6):1197-1203. doi:10.1097/IAE.0b013e31822f55f3.

Palii SS, Afzal A, Shaw LC, a kol. Nonpeptide somatostatin receptor agonists specifically target ocular neovascularization via the somatostatin type 2 receptor. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49(11):5094-5102. doi:10.1167/iovs.08-2289.

Perrone L, Devi TS, Hosoya K-I, Terasaki T, Singh LP. Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy. Cell Death Dis. 2010;1(8):e65. doi:10.1038/cddis.2010.42.

Perrone L, Matrone C, Singh LP. Epigenetic Modifications and Potential New Treatment Targets in Diabetic Retinopathy. J Ophthalmol. 2014;2014:1-10. doi:10.1155/2014/789120. Petrovič D. Candidate Genes for Proliferative Diabetic Retinopathy. BioMed Res. 2013;2013(Article ID 540416). doi:10.1155/2013/540416.

Petrovič GM, Steblovník K, Peterlin B, Petrovič D. The - 429 T/C and - 374 T/A gene poly-

morphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2003;220(12):873-876. doi:10.1055/s-2003-812553.

Petrovič MG, Cilenšek I, Petrovič D. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with diabetic retinopathy in Slovene (Caucasians) type 2 diabetes patients. *DisMarkers.* 2008;24(1):59-64.

Petrovič MG, Hawlina M, Peterlin B, Petrovič D. BgIII gene polymorphism of the alpha2beta1 integrin gene is a risk factor for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *J Hum Genet.* 2003;48(9):457-460. doi:10.1007/s10038-003-0060-0.

Petrovič MG, Korosec P, Kosnik M, a kol. Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2008;14(January):1382-1387.

Petrovič MG, Krkovic M, Osredkar J, Hawlina M, Petrovič D. Polymorphisms in the promoter region of the basic fibroblast growth factor gene and proliferative diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2008;36(2):168-172. doi:10.1111/j.1442-9071.2007.01647.x.

Petrovič MG, Kruzliak P, Petrovič D. The rs6060566 of the reactive oxygen species modulator 1 (Romo-1) gene affects Romo-1 expression and the development of diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Acta Ophthalmol.* 2015;1:654-657. doi:10.1111/aos.12723.

Petrovič MG, Osredkar J, Saraga-Babić M, Petrovič D. K469E polymorphism of the intracellular adhesion molecule 1 gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasians with Type 2 diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2008;36(5):468-472.

Porojan MD, Cătană A, Popp RA, Dumitrascu DL, Bala C. The role of NOS2A -954G/C and vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and diabetic nonproliferative retinopathy risk management. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:1743-1748. doi:10.2147/TCRM.S93172.

Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet.* 2009;88(4):495-515. doi:10.1007/s12041-009-0068-0.

Qiu M, Xiong W, Liao H, Li F. VEGF -634G>C polymorphism and diabetic retinopathy risk: A meta-analysis. *Gene.* 2013;518(2):310-315. doi:10.1016/j.gene.2013.01.018.

Radha V, Rema M, Mohan V. Genetic and diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol.* 2002;50(1):5-11.

Ramprasad S, Radha V, Mathias R a, Majumder PP, Rao MRS, Rema M. Rage gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy in a clinic-based population from South India. *Eye (Lond).* 2007;21(May 2005):395-401. doi:10.1038/sj.eye.6702239.

Ramus SM, Kumse T, Globocnik Petrovič M, Petrovič D, Cilenšek I. SNP rs2073618 of the osteoprotegerin gene is associated with diabetic retinopathy in Slovenian patients with type 2 diabetes. *Biomed Res Int.* 2013;2013:364073. doi:10.1155/2013/364073.

Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia.* 2015;58(3):443-455. doi:10.1007/s00125-014-3462-y. Reiter CEN, Gardner TW. Functions of insulin and insulin receptor signaling in retina: Possible implications for diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(4):545-562. doi:10.1016/S1350-9462(03)00035-1.

Richeti F, Noronha RM, Waetge RTL, a kol. Evaluation of AC(n) and C(-106)T polymorphisms of the aldose reductase gene in Brazilian patients with DM1 and susceptibility to diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2007;13(May):740-745. doi:v13/a80 [pii].

Rosales MAB, Silva KC, de Faria JBL, de Faria JML. Exogenous sod mimetic tempol ameliorates the early retinal changes reestablishing the redox status in diabetic hypertensive rats. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(8):4327-4336. doi:10.1167/iovs.09-4690.

Roy MS. Assessment of 193 Candidate Genes for Retinopathy in African Americans With Type 1 Diabetes. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(5):605. doi:10.1001/archophthalmol.2009.48. Saleem S, Azam A, Maqsood SI, a kol. Role of ace and pai-1 polymorphisms in the develo-

pment and progression of diabetic retinopathy. PLoS One. 2015;10(12):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0144557.

Santos A, Salguero ML, Gurrola C, Muñoz F, Roig-Melo E, Panduro A. The epsilon4 allele of apolipoprotein E gene is a potential risk factor for the severity of macular edema in type 2 diabetic Mexican patients. Ophthalmic Genet. 2002;23(1):13-19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910554>.

Santos KG, Crispim D, Canani LH, Ferrugem PT, Gross JL, Roisenberg I.) gene polymorphisms with diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. Ophthalmic Genet. 2012;33(1):23-27. doi:10.3109/13816810.2011.620057.

Santos KG, Tschiedel B, Schneider J, Souto K, Roisenberg I. Diabetic retinopathy in Euro-Brazilian type 2 diabetic patients: Relationship with polymorphisms in the aldose reductase, the plasminogen activator inhibitor-1 and the methylenetetrahydrofolate reductase genes. Diabetes Res Clin Pract. 2003;61(2):133-136. doi:10.1016/S0168-8227(03)00112-8.

Scott IU, Jackson GR, Quillen D a, Klein R, Liao J, Gardner TW. Effect of Doxycycline vs Placebo on Retinal Function and Diabetic Retinopathy Progression in Mild to Moderate Nonproliferative Diabetic Retinopathy: A Randomized Proof-of-Concept Clinical Trial. JAMA Ophthalmol. 2014;85(9):1-6. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.1422.

Semeraro F, Cancarini A, Dell'Omo R, Rezzola S, Romano MR, Costagliola C. Diabetic retinopathy: Vascular and inflammatory disease. J Diabetes Res. 2015;2015. doi:10.1155/2015/582060.

Sesti LFC, Crispim D, Canani LH, a kol. The -308G>a polymorphism of the TNF gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasian Brazilians with type 2 diabetes. Investig Ophthalmol Vis Sci. 2015;56(2):1184-1190. doi:10.1167/iov.14-15758.

Shahin RMH, Abdelhakim MASE, Owid MESM, El-Nady M. A Study of VEGF Gene Polymorphism in Egyptian Patients with Diabetic Retinopathy. Ophthalmic Genet. 2014;(1744-5094 (Electronic)):1-6. doi:10.3109/13816810.2014.881508.

Sheu WH-H, Kuo JZ, Lee I-T, a kol. Genome-wide association study in a Chinese population with diabetic retinopathy. Hum Mol Genet. 2013;22(15):3165-3173. doi:10.1093/hmg/ddt161.

Silva KC, Pinto CC, Biswas SK, Souza DS, Lopes de Faria JB, Lopes de Faria JM. Prevention of hypertension abrogates early inflammatory events in the retina of diabetic hypertensive rats. Exp Eye Res. 2007;85(1):123-129. doi:10.1016/j.exer.2007.03.008.

Silva KC, Rosales M a B, Biswas SK, Faria JBL De, Faria JML De. Mitochondrial Oxidative Stress and Is Improved by an Angiotensin Receptor Blocker in a Model Combining Hypertension and Diabetes. 2009;58(February). doi:10.2337/db09-0166.K.C.S.

Silva KC, Rosales M a B, de Faria JBL, de Faria JML. Reduction of inducible nitric oxide synthase via angiotensin receptor blocker prevents the oxidative retinal damage in diabetic hypertensive rats. Curr Eye Res. 2010;35(6):519-528. doi:10.3109/02713681003664923. Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. Trends Endocrinol Metab. 2014;25(1):23-33. doi:10.1016/j.tem.2013.09.005. Simó R, Hernández C. Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence. Prog Retin Eye Res. 2015;48:160-180. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.04.003.

Simó R, Sundstrom JM, Antonetti DA. Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. Diabetes Care. 2014;37(4):893-899. doi:10.2337/dc13-2002.

Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Genetics in diabetic retinopathy: current concepts and new insights. Curr Genomics. 2013;14(5):289-299. doi:10.2174/13892029113149990008.

Singh K, Kant S, Singh VK, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. Toll-like receptor 4 polymorphisms and their haplotypes modulate the risk of developing diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. Mol Vis. 2014;20(January):704-713.

Sivaprasad S, Gupta B, Crosby-Nwaobi R, Evans J. Prevalence of Diabetic Retinopathy in Various Ethnic Groups: A Worldwide Perspective. Surv Ophthalmol. 2012;57(4):347-370.

doi:10.1016/j.survophthal.2012.01.004.

Sjolie AK, Klein R, Porta M, et al. Effect of candesartan on progression and regression of retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect 2): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2008;372(9647):1385-1393. doi:10.1016/S0140-6736(08)61411-7.

Sobrin L, Green T, Sim X, et al. Candidate gene association study for diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Candidate gene Association Resource (CARE). *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(10):7593-7602. doi:10.1167/iovs.11-7510.

Song Z-D, Tao Y, Han N, Wu Y-Z. Association of the Aldose Reductase-106TT Genotype with Increased Risk for Diabetic Retinopathy in the Chinese Han Population: An Updated Meta-Analysis. *Curr Eye Res*. 2016;41(8):1087-1091. doi:10.3109/02713683.2015.1084642.

Stewart MW. Aflibercept (VEGF Trap-eye): the newest anti-VEGF drug. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(9):1157-1158. doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300654.

Su X, Chen X, Liu L, Chang X, Yu X, Sun K. Intracellular Adhesion Molecule-1 K469E Gene Polymorphism and Risk of Diabetic Microvascular Complications: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(7):3-8. doi:10.1371/journal.pone.0069940.

Suehiro M, Ohkubo K, Kato H, et al. Analyses of serum lipoprotein(a) and the relation to phenotypes and genotypes of apolipoprotein(a) in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002;110(7):319-324. doi:10.1055/s-2002-34997.

Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2006;12(May 2005):336-341. doi:10.1167/journal.molvis.12.5.336 [pii].

Sun H, Cong X, Sun R, Wang C, Wang X, Liu Y. Association between the ICAM-1 K469E polymorphism and diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;104(2):e46-e49. doi:10.1016/j.diabres.2014.01.028.

Sun JK, Keenan HA, Cavallerano JD, et al. Protection From Retinopathy and Other Com-

plications in Patients With Type 1 Diabetes of Extreme Duration: The Joslin 50-Year Medalist Study. *Diabetes Care*. 2011;34(4):968-974. doi:10.2337/dc10-1675.

Sydorova M, Lee MS. Vascular endothelial growth factor levels in vitreous and serum of patients with either proliferative diabetic retinopathy or proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res*. 2005;37(4):188-190. doi:10.1159/000086594.

Szaflik JP, Majsterek I, Kowalski M, et al. Association between sorbitol dehydrogenase gene polymorphisms and type 2 diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2008;86(4):647-652. doi:10.1016/j.exer.2008.01.009.

Szaflik JP, Wysocki T, Kowalski M, et al. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(1):39-43. doi:10.1007/s00417-007-0674-6.

Takagi H, King GL, Aiello LP. Hypoxia upregulates glucose transport activity through an adenosine-mediated increase of GLUT1 expression in retinal capillary endothelial cells. *Diabetes*. 1998;47(9):1480-1488. doi:10.2337/diabetes.47.9.1480.

Tariq K, Malik SB, Ali SHB, et al. Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator activated receptor gamma with proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2013;19(October 2012):710-717.

Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, Poirier O, Danilov S, Parving HH. Lack of relationship between an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene and diabetic neuropathy and proliferative retinopathy in IDDM patients. *Diabetes*. 1995;44 (5): 489-494.

Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmol*. 2012;2013:343560. doi:10.1155/2013/343560.

Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, Ceriello A. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients*. 2016;8(5):1-13. doi:10.3390/nu8050310.

Tewari S, Kowluru R. Regulation Of Mitochondrial DNA Damage And POLG In Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(14):5422.

Thorsen SU, Sandahl K, Nielsen LB, a kol. Polymorphisms in the CTSH gene may influence the progression of diabetic retinopathy: a candidate-gene study in the Danish Cohort of Pediatric Diabetes 1987 (DCPD1987). *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253(11):1959-1965. doi:10.1007/s00417-015-3118-8.

Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, a kol. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*. 2000;6(4):4-7. doi:10.1038/74725.

Tian C, Fang S, Du X, Jia C. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: A meta-analysis. *Diabetologia*. 2011;54(4):803-811. doi:10.1007/s00125-010-2004-5.

Tong Z, Yang Z, Patel S, a kol. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(19):6998-7003. doi:10.1073/pnas.0800454105.

Uhlmann K, Kovacs P, Boettcher Y, Hammes HP, Paschke R. Genetics of diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2006;114(6):275-294.

Uthra S, Raman R, Mukesh BN, a kol. Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy in a south Indian cohort. *Ophthalmic Genet*. 2008;29(1):11-15.

van Dieren S1, Beulens JW, van der Schouw YT, Grobbee DE NB. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2010;may(17):3-8. doi:10.1097/01.hjr.0000368191.86614.5a.

Van Hecke M V, Dekker JM, Nijpels G, a kol. Homocysteine, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine are associated with retinal microvascular abnormalities: the Horn Study. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(7):479-487. doi:10.1042/CS20070275.

Vanita V. Association of RAGE (p.Gly82Ser) and MnSOD (p.Val16Ala) Polymorphisms with

Diabetic Retinopathy in T2DM Patients from North India. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;104(1):155-162.doi:10.1016/j.diabres.2013.12.059.

Vierkotten S, Muether PS, Fauser S. Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components. *PLoS One*. 2011;6(8). doi:10.1371/journal.pone.0022959.

Vistoli G, De Maddis D, Cipak a, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013;47 Suppl 1(August):3-27. doi:10.3109/10715762.2013.815348.

Wang J, Ming Yang M, Rong SS, Ng TK, Li YB, Liu XM. Association of paraoxonase gene polymorphisms with diabetic nephropathy and retinopathy. *Mol Med Rep*. 2013;8(6):1845-1851. doi:10.3892/mmr.2013.1710.

Wang J, Yang MM, Li YB, Liu GD, Teng Y, Liu XM. Association of CFH and CFB gene polymorphisms with retinopathy in type 2 diabetic patients. *Mediators Inflamm*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/748435.

Wang Y, Ng MC, Lee SC, So WY, Tong PC, Cockram CS, a kol. Phenotypic heterogeneity and associations of two aldose reductase gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(8):2410-2415.

White NH, Cleary PA, Dahms W, Goldstein D, Malone J, Tamborlane WV, a kol. Beneficial effects of intensive therapy of diabetes during adolescence: Outcomes after the conclusion of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *J Pediatr*. 2001;139(6):804-812.

Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):752-765. doi:10.1016/j.biocel.2005.08.002.

Winocour PH, Bhatnagar D, Ishola M, Arrol S, Durrington PN. Lipoprotein (a) and Microvascular Disease in Type 1 (Insulin-dependent) Diabetes. *Diabetic Medicine*. 1991;8(10):922-927. doi:10.1111/j.1464-5491.1991.tb01531.x

Wong CM, Wong CCL, Ng YL, Au SLK, Ko FCF, Ng IOL. Transcriptional repressive H3K9 and H3K27 methylations contribute to DNMT1-mediated DNA methylation recovery. *PLoS One*. 2011;6(2). doi:10.1371/journal.pone.0016702.

Wong TY, Klein R, Islam FMA, a kol. Diabetic Retinopathy in a Multi-ethnic Cohort in the United States. *Am J Ophthalmol*. 2006;141(3). doi:10.1016/j.ajo.2005.08.063.

Wong TY, Liew G, Tapp RJ, a kol. Relation between fasting glucose and retinopathy for diagnosis of diabetes: three population-based cross-sectional studies. *Lancet*. 2008;371(9614):736-743. doi:10.1016/S0140-6736(08)60343-8.

Wu JC, Li XH, Peng YD, Wang JB, Tang JF, Wang YF. Association of two glyoxalase I gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(10):343-348. doi:10.3275/7856.

Wu JH, Gao Y, Ren AJ, a kol. Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res*. 2012;47(4):195-201. doi:10.1159/000331992.

Xu Y, Jiang Z, Huang J, Meng Q, Coh P, Tao L. The association between toll-like receptor 4 polymorphisms and diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Br J Ophthalmol*. 2015;99(9):1301-1305. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-306677.

Yang B, Cross DF, Ollerenshaw M, Millward BA, Demaine AG. Polymorphisms of the vascular endothelial growth factor and susceptibility to diabetic microvascular complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2003;17(1):1-6. doi:10.1016/S1056-8727(02)00181-2.

Yang J, Fan XH, Guan YQ, Li Y, Sun W, Yang XZ LR. MMP-2 gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2010;3:137-140. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2010.02.10.

Yang L, Wu Q, Li Y, Fan X, Hao Y, Sun H, a kol. Association of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and circulating RAGE levels with diabetic retinopathy in Chinese population. *J Diabetes Res*. 2013; doi: 10.1155/2013/264579.

Yang X, Deng Y, Gu H, a kol. Candidate gene association study for diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Vis*. 2014;20(February 2013):200-214.

Yang X, Deng Y, Gu H, a kol. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Mol Vis*. 2011;17(November):3088-3096.

Yang Y, Andresen BT, Yang K, a kol. Association of vascular endothelial growth factor -634C/G polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetic Han Chinese. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235(10):1204-1211. doi:10.1258/ebm.2010.010102.

Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, a kol. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;35:556-564. doi:10.2337/dc11-1909.

Yigit S, Karakus N, Inanir A. Association of MTHFR gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Mol Vis*. 2013;19(1090-0535 (Electronic)):1626-1630.

Yoshida Y, Yamagishi S-I, Matsui T, Jinnouchi Y, Fukami K, Imaizumi T, a kol. Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25(7):678-86.

Yoshioka (2003) No association between the MTHFR gene polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without overt nephropathy

Zeng J, Chen B. Epigenetic mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Ophthalmologica*. 2014;232(1):1-9. doi:10.1159/000357824.

Zeng J, Chen B. Epigenetic mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Ophthalmologica*. 2014;232(1):1-9. doi:10.1159/000357824.

Zeng J, Chen Y, Tong Z, a kol. Lack of association of CFD polymorphisms with advanced age-related macular degeneration. 2010;(May):2273-2278.

Zeng Y, Dai F, Yang K, Tang Y, Xu M, Zhou Y. Association between a vascular endothelial growth factor gene polymorphism (rs2146323) and diabetic retinopathy: a meta-analysis. BMC Ophthalmol. 2015;15(1):163. doi:10.1186/s12886-015-0155-3.

Zhang H, Chen L, Wang L, a kol. Association of 1704G / T and G82S polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products gene with diabetic retinopathy in Chinese population. PubMed Commons. J Endocrinol Invest. 2009;32(3):258-262.

Zhang J, McGwin G. Association of statin use with the risk of developing diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol. 2007;125(8):1096-1099. doi:10.1001/archophth.125.8.1096.

Zhang T, Pang C, Li N, Zhou E, Zhao K. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and retinopathy risk in type 2 diabetes: a meta-analysis. BMC Med. 2013;11:1. doi:10.1186/1741-7015-11-1.

Zhang X, Saaddine JB, Chou C-F, a kol. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008. Jama. 2010;304(6):649-656. doi:10.1001/jama.2010.1111.

Zhang XY, Liu W, Wu SS, Jin JL, Li WH, Wang NL. Calcium dobesilate for diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. Sci China Life Sci. 2014;58(1):101-107. doi:10.1007/s11427-014-4792-1.

Zhang Y, Meng N, Lv Z, Li H, Qu Y. The gene polymorphisms of UCP1 but not PPAR β and TCF7L2 are associated with diabetic retinopathy in Chinese type 2 diabetes mellitus cases. Acta Ophthalmol. 2015;93(3):e223-e229. doi:10.1111/aos.12542.

Zhao S, Li T, Zheng B, Zheng Z. Nitric oxide synthase 3 (NOS3) 4b/a, T-786C and G894T polymorphisms in association with diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis. Ophthalmic Genet. 2012;33(4):200-207. doi:10.3109/13816810.2012.675398.

Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: Role of histone methylation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(1):244-250. doi:10.1167/iov.12-10854.

Zhong Q, Kowluru RA. Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy. Diabetes. 2013;62(7):2559-2568. doi:10.2337/db12-1141.

Zhong Q, Kowluru RA. Role of histone acetylation in the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon. J Cell Biochem. 2010;110(6):1306-1313. doi:10.1002/jcb.22644.

Zhong X, Du Y, Lei Y, Liu N, Guo Y, Pan T. Effects of vitamin D receptor gene polymorphism and clinical characteristics on risk of diabetic retinopathy in Han Chinese type 2 diabetes patients. Gene. 2015;566(2):212-216. doi:10.1016/j.gene.2015.04.045.

Zhou J-B, Yang J-K. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with proliferative diabetic retinopathy: a meta-analysis. Acta Diabetol. 2010;47(Suppl 1):187-193. doi:10.1007/s00592-009-0160-1.

Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. Curr Diab Rep. 2011;11(4):244-252. doi:10.1007/s11892-011-0198-7.

MONOGRAFIE:

Hrazdira I, Mornstein FkIV. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. 1. vydanie. Brno: Neptun. 2001; ISBN 80-902896-1-4.

Hulín I, a kol. Patofyziológia. Slovak Academic Press. 2002; ISBN 8089104053.

International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. Seventh edition. 2015; ISBN: 978-2-930229-81-2.

Kišňová S, Hulín I, a kol. Interná medicína. ProLitera. 2013; ISBN 9788097025397.

Klener, a kol. Vnitřní lékařství. 4. přepracované a doplněné vydání. Galén. 2011; EAN 9788072627059.

LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM. Diabetes mellitus. A Fundamental and Clinical text. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2004; ISBN 0-7817-4097-5.

Mohan H, a kol. Patológia. Balneotherma. 2011; ISBN 9788097015664.

INÉ ZDROJE:

Odkaz 1:

<http://wjscottmd.com/diabetic-retinopathy/>

Odkaz 2:

<http://www.ncascade.com/wp-content/uploads/2013/07/diabetic-eye.png>

Odkaz 3:

<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/>

Odkaz 4:

<http://www.intechopen.com/books/ophthalmology-current-clinical-and-research-updates/diabetic-retinopathy-an-update-on-pathophysiology-classification-investigation-and-treatment>

Odkaz 5:

https://classconnection.s3.amazonaws.com/101/flashcards/2224101/jpg/complement_system1360434340691.jpg

11. ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1

Súhrn polymorfizmov identifikovaných štúdiami kandidátnych génov v mozgnej asociácii s DR

Tab. 2

Kandidátne gény identifikované Roy a kol., 2009 nesúce polymorfizmus asociovaný s DR (zvýraznené gény asociované aj s progresiou DR)

Tab. 3

Kandidátne gény identifikované Roy a kol., 2009 nesúce polymorfizmus asociovaný s progresiou DR

Tab. 4

Súhrn genomických regiónov identifikovaných väzbovými štúdiami v mozgnej asociácii s DR pri DM2

Tab. 5

Súhrn SNP identifikovaných celogénomovými asociačnými štúdiami (GWAS) v súvislosti s DR

Tab. 1: Súhrn polymorfizmov identifikovaných štúdiami kandidátnych génov v možnej asociácii s DR (¹Ch. - chromozóm, ²Ref. - referencie, ³multi-etnická - zistenia štúdií bez ohľadu na etnicitu alebo výsledky meta-analýz, ⁴TSG - tumor supresorový gén, ⁵POS - reakívna forma kyselika, ⁶HbA1C - glykovaný hemoglobín, ⁷RAAS - renín-angiotenzín - aldosterón systém, ⁸VNTR - tandemové opakovania variabilného počtu ⁹ECM - extracelulárny matrix, ¹⁰INS/DEL - inzercia/delecia)

Gén	Názov génu	Funkcia	Polymorfizmus	Ch.1	DM	Populácia	Komentár – vzťah k DR
AKR1B1/ ALR2	aldózoreduk- táza	polyolová dráha – konverzia glukózy na sorbitol	rs35839483 ((CA) n dimukleotidové opakovania)	7	1 a 2	čínska, japonská, indická, čínska, brazílska	Ko a kol., 1995; Fujisawa a kol., 1999; Ichikawa a kol., 1999; Ikegishi a kol., 1999; Lee a kol., 2001; Wang a kol., 2003; Richeti a kol., 2007; Abhary a kol., 2010
			rs759853 (c. C-106T)	7	2	euro-brazil- ska, čínska, Chanová, japonská	T alela protek- tívny účinok, ale miera asociácie rôzna v štúdiách
			rs9640883	7	2	austrálska	asociácia s nástupom diabetu
SDH	sorbitoldehy- drogenáza	polyolová dráha – konverzia sorbitolu na fruktózu	rs2055858 (c. C-1214G)	15	2	poľská	slabá asociácia; polymorfizmus pravdepodobne ovplyvňuje silu promótora
			rs3759890 (c. G-888C)	15	2	japonská, poľská, kauka- zoidná-brazil- ska	Amano a kol., 2003; Ferreira a kol., 2013

ALDH2	mitochon- driová alde- hydehydro- genáza 2	polyolová dráha – transformácia acetaldehydu na kyselinu octovú, inhibuje tvorbu AGEs	ALDH2*2	12	2	japonská	asociovaný s protektívnym účinkom	Morita a kol., 2013
RAGE	receptor pre koncové produkty pokročilej glykácie	aktivácia prozápalových génov	rs1800624 (c. T-374A)	6	2	indická, čínska, afro-brazilská, kaukazoidná - škandinávská	nekonzistentné zistenia a slabá asociácia, mož- no interagujú s HbA1C6	Abhary a kol., 2009; Hudson a kol., 2001; Balasubbu a kol., 2010; Vanita, 2014
			rs1800625 (c. T-429C)	6	2	kaukazoid- ná, indická, dánska	nekonzistent- né zistenia a slabá asociácia, polymorfizmy spôsobujú zmeny aktivity receptora	Kumaranickavel a kol., 2002; Petrovic a kol., 2003; Balasubbu a kol., 2010; Yang a kol., 2013; Vanita, 2014; Thorsen a kol., 2015
			rs2070600 (p. G82S)	6	2	kaukazoidná, indická, čínska, malajzijská	asociovaný, okrem malajzi- jskej populácie	Abhary a kol., 2009; Ng a kol., 2012; Yang a kol., 2013
TNF-α	tumor nekro- tizujúci faktor alfa	multifunkčný prozápalový cytokín (bunková proliferácia, diferenciácia, apoptóza, lipi- dový metabo- lizmus a koag- ulácia)	rs361525 (c. G-238A), rs1800629 (c. G-308A), rs1799724 (c. C-857T)	6	2	indická, kaukazoidná - brazílska	rs361525 AA genotyp pred- stavuje riziko PDR v indickej populácii, rs1800629 asociovaný s PDR v brazílskej (kaukazoidnej) populácii	Kumaranickavel a kol., 2001; Paine a kol., 2012; Sesti a kol., 2015

Gén	Názov génu	Funkcia	Polymorfizmus	Ch.1	DM	Populácia	Komentár – vzťah k DR
TNF-β/ LTA	tumor nekrotizujúci faktor beta/lymfotoxín beta	cytokín – zápal, stimulátor imunitného systému, antivirálna odpoveď, apoptóza	NcoI (GT)n mikrosatelit	6 6	2 2	kaukazoidná – slovenská, multietnická indická	β2 alela je rizikový faktor PDR počas T2DM alela 4 (103 bp) nízke riziko, alela 8 (111bp) je asociovaná s PDR
IL-10	interleukín-10	cytokín - pleiotropný účinnok v imunoregulácii a zápale	n. A-1082G	1	2	indická	G alela je rizikový faktor pre PDR
VEGF	vaskulárny endotelový rastový faktor	stimulácia neo-vaskulogenézy a angiogenézy	rs2010963 (c. C-634G)	6	2	japonská, indická, kaukazoidná	C alela rizikový faktor NPDR pri T2DM
			c. C-460T	6	1 a 2	kaukazoidná	možná asociácia
			rs25648	6	2	multietnická ³	T alela zvyšuje riziko, ale zistenia nekonzistentné
			rs1570360 (c. A-116G)	6	2	multietnická	nekonzistentné zistenia

VEGF	vaskulárny endotelový rastový faktor	stimulácia neo-vaskulogenézy a angiogenézy	rs3095039	6	2	multietnická	T alela zvyšuje riziko, ale zistenia nekonzistentné	Awata a kol., 2002; Uthra a kol., 2008; Abhary a kol., 2009; Kangas-Konto a kol., 2009
			rs35569394	6	1 a 2	multietnická	(-2549) DEL zvyšuje riziko, ale zistenia nekonzistentné	Abhary a kol., 2009
			rs699947 (c. A-2578C)	6	2	multietnická	A alela zvyšuje riziko, ale zistenia nekonzistentné	Abhary a kol., 2009; Kangas-Konto a kol., 2009; Nakanishi a kol., 2009; Nakamura a kol., 2010; Yang a kol., 2011; Gong a kol., 2013
			rs13207351 (c. A-152G)	6	1 a 2	kaukazoidná	asociovaný s PDR v niektorých štúdiách	Awara a kol., 2002; Churchill a kol., 2008; Yang a kol., 2011
			rs735286 (c. C4618T)	6	1 a 2	kaukazoidná	SNP v haplotype asociovaný so závažnosťou	Churchill a kol., 2008
			rs2146323 (c. C5092A)	6	1 a 2	kaukazoidná	SNP v haplotype asociovaný so závažnosťou, asociovaný so skoršou progresiou	Churchill a kol., 2008; Nakanishi a kol., 2009; Zeng a kol., 2015
			rs833061 (c. C-1498T)	6	2	čínska	nekonzistentné zistenia a slabá asociácia	Awata a kol., 2002; Suganthalakshmi a kol., 2006; Szaflik a kol., 2008; Yang a kol., 2011
			rs3025021	6	2	čínska	nepreukazné	Abhary a kol., 2009; Yang a kol., 2011
			rs10434	6	1 a 2	kaukazoidná	G alela asociovaná s poruchami videnia	Abhary a kol., 2009
			rs833068	6	1 a 2	kaukazoidná	G alela rizikový faktor	Abhary a kol., 2009
			rs833070	6	1	japonská	slabo asociovaný so skorou progresiou	Nakanishi a kol., 2009
			rs3025039 (c. C936T)	6	2	kaukazoidná	T alela rizikový faktor	Porjani a kol., 2015

Gén	Názov génu	Funkcia	Polymorfizmus	Ch.1	DM	Populácia	Komentár – vzťah k DR
bFGF/ FGF2	fibroblastový rastový faktor 2	stimulácia angio- genézy a reparácia tkanív	rs41456044 rs308395 c. C-754G c. T-553A; c. T-834A	4 4 4 4	2 2 2 2	multietnická multietnická slovenská kaukazoidná	Abhary a kol., 2009 Abhary a kol., 2009 Beránek a kol., 2008 Petrovič a kol., 2008
IGF-1	rastový faktor podobný inzulínu 1	stimulácia bun- kového rastu a proliferácie, inhibícia apoptózy	(CA)n	4	2	indická	Kýtnarová a kol., 2009
EPO	erytropoetín	kontrola ery- tropoézy, stimulácia proliferácie, migrá- cia a angiogenéza v hypoxických podmienkach	rs1617640, rs507392, rs551238	7	1 a 2	multietnická, americká eu- rópskeho pôvo- du, austrálska	Tong a kol., 2008; Abhary a kol., 2009; Abhary a kol., 2010

PEDF/ SER- PINF1	faktor odvodený z pigmentového epitelu/ inhibitor serpínovej peptidázy	antioxidačné vlastnosti, inhibícia angiogenézy, neuro- trofný faktor	rs12150053, rs12948385, rs8697961, rs1126287	17	2	multietnická	nie sú asocio- vané	Wong a kol., 2006; Abhary a kol., 2009
ACE	angiotenzín konvertujúci enzým	súčasť RAAS7 – ak- tivácia angiotenzínu	rs4646994 (c. G2350A) - INS/DEL v intróne 16	17	1 a 2	kaukazoid- ná - slovinská, dánska; japon- ská, multiet- nická, iránska, japonská, čínska, pakistanská	D alela slabo asociovaná pri T2DM v čínskej populácii, ale nekonzistentné zistenia a slabá asociácia v ostatných pop- uláciách, asocio- vaný s NPDR u Pakistancov	Nikzamid a kol., 2010; Zhou, Yang; 2010; Lu a kol., 2012; Liang a kol., 2013; Sal- eem a kol., 2015
GSTT1	glutión S-transferáza T1	detoxifikačný enzým - konjugácia redu- kovaného glutatiónu na zlúčeniny	nulový genotyp	22	2	kaukazoidná - slovinská	zvyšuje riziko	Cilenšek a kol., 2012
GSTM1	glutión S-transferáza M1	detoxifikačný enzým - konjugácia redu- kovaného glutatiónu na zlúčeniny	nulový genotyp	1	2	kaukazoidná - slovinská	znižuje riziko	Cilenšek a kol., 2012
SOD2/ MnSOD	mitochondrio- vá superoxid- dismutáza 2	transformácia ROS na peroxid a kyslík	rs4880 (c. C47T, p. A16V)	6	1 a 2	slovinská (kauka- zoidná), fínska, indická	C alela redukuje riziko, nepot- vrdené v indickej populácii	Petrovič a kol., 2008; Abhary a kol., 2009; Kangas-Kon- tio a kol., 2009; Nik- zamid a kol., 2010; Tian a kol., 2011; Vanita, 2014

Gén	Názov génu	Funkcia	Polymorfizmus	Ch.1	DM	Populácia	Komentár – vzťah k DR	Suganthalakshmi a kol., 2006; Chen a kol., 2007; Abhary a kol., 2009; Cheema a kol., 2012; Zhao a kol., 2012; Santos a kol., 2012
eNOS3	endotelová syntáza oxidu dusnatého	syntéza oxidu dusnatého – vazodilatácia	rs3138808 (27 VNTR8 intrón 4 a/b)	7	2	indická, západoafrická, brazílska (kaukazoidná)	4a alela protektívny efekt	Suganthalakshmi a kol., 2006; Chen a kol., 2007; Abhary a kol., 2009; Cheema a kol., 2012; Zhao a kol., 2012; Santos a kol., 2012
			rs1799983 (c. C894T)	7	2	brazílska (kaukazoidná), dánska, multietnická	G alela zvyšuje riziko, ale slabá asociácia	Suganthalakshmi a kol., 2006; Abhary a kol., 2009; Bazzas a kol., 2010; Santos a kol., 2012; Zhao a kol., 2012; Thorsen a kol., 2015
			rs41322052 (c. T-784C)	7	1 a 2	brazílska (kaukazoidná), multietnická	nekonzistentné zistenia a slabá asociácia	Suganthalakshmi a kol., 2006; Zhao a kol., 2012; Brondani a kol., 2012; Santos a kol., 2012
			rs2297518 (c. G-954C)	7	2	kaukazoidná	protektívny faktor pred NPDR	Porojan a kol., 2015
APOE	apolipoprotein E	transport lipoproteínov, v tukoch rozpustných vitamínov a cholesterolu	E2/E3/E4	19	1 a 2	mexická, multietnická (kaukazoidná, afroamerická)	nekonzistentné zistenia a slabá asociácia, možno tvrdých exudátov u Afroameričanov	Santos a kol., 2002; Liew a kol., 2006
CFH	komplementový faktor H	regulátor aktívacie komplementu	rs800292 (p. I62V)	1	2	čínska	asociovaný	Wang a kol., 2013

CFB	komplementový faktor B	regulátor aktívacie komplementu	rs1048709	6	2	čínska	asociovaný	Wang a kol., 2013; Liu a kol., 2014
EDN1	endotelín-1	vazokonstrikcia	rs5370 (p. K198N)	6	2	čínska	redukuje riziko	Li a kol., 2008; Roy a kol., 2009
HTRA1/ARMS2	HTRA serín peptidáza 1/ age-related maculopathy susceptibility 2	proteáza – regulácia rastových faktorov podobných inzulínu, možný regulátor bunkového rastu, neovaskularizácia	rs11200638, rs10490924	10	2	indická	nevýznamná asociácia	Balasubbu a kol., 2010
PAI-1	inhibitor aktivátora plazminogénu 1	inhibitor proteázy – inhibitor aktívacie plazminogénu, remodelácia a reparácia tkanív	rs1799768 (4G/5G INS/DEL)	7	2	kaukazoidná, brazílska (kaukazoidná), multietnická, pakistanská, indická	4G/5G alela zvyšuje riziko ale zistenia nekonzistentné, etnické nezrovnalosti	Nagi a kol., 1997; Santos a kol., 2003; Balasubbu a kol., 2010; Zhang a kol., 2013; Saleem a kol., 2015
IT-GA2B1	integrín α2β1	medzibunkové a bunkovo-ECM9 interakcie	RFLP - Bgl II	5, 10	2	japonská, kaukazoidná	rizikový faktor	Matsubara a kol., 2000; Petrovič a kol., 2003; Abhary a kol., 2009
ICAM1	intercelulárna adhezívna molekula 1	stabilizácia medzibunkových interakcií, sprostredkovanie migrácie leukocytov cez endotel	rs13306430 rs5498 (p. K469E)	19 19	2 2	multietnická čínska, indická, japonská, kaukazoidná - slovinská	G alela protektívny účinok nekonzistentné zistenia, nesúlad možno spôsobený etnicitami	Abhary a kol., 2009; Roy a kol., 2009 Liu a kol., 2006; Petrovič a kol., 2008; Balasubbu a kol., 2010; Zhu a kol., 2010; Su a kol., 2013; Sun a kol., 2014; Lv a kol., 2015

Gén	Názov génu	Funkcia	Poly-morfizmus	Ch.1	DM	Populácia	Komentár – vzťah k DR	
CTSH	katepsín H	lyzozomálna proteínáza – degradácia lyzozomálnych proteínov, predpokladaná úloha v zmenách mikrocirkulácie	rs3825932	15	1	dánska	T alela asociovaná so zníženým rizikom progresie PDR nezávisle od glykemickej kontroly	Thorsen a kol., 2015
MMP-2	matrixová metaloproteináza 2	rozpad ECM9	c. C-1306T	16	2	čínska	T alela asociovaná s PDR	Yang a kol., 2010
MTHFR	metyléntetrahydrofolátreduktáza	remetylácia homocysteínu na metionín	rs1801133 (c. C677T)	1	2	japonská, brazílska (kaukazoidná), turecká, multietnická	kontroverzné zistenia, T alela rizikový faktor prostredníctvom hyperhomocysteinémie	Santos a kol., 2003; Yoshioka a kol., 2003; Roy a kol., 2009
MCP-1/CCL2	monocyty chemoatraktantný proteín 1	cytokín – aktivácia monocytov, makrofágov a lymfocytov	rs1024611 (c. A-2518G)	17	2	čínska, kórejská, japonská	G alela asociovaná s náchylnosťou, hlavne k PDR v kórejске populácii	Katakami a kol., 2010; Jeon a kol., 2013; Dong a kol., 2014
NPY	neuropeptid Y	vazokonstriktoria, angio-genéza	rs16139 (p. L7P)	7	2	fínska	asociovaný	Niskanen a kol., 2000
OPG/OCIF	osteoprotegerín/inhibičný faktor osteoklastogénny	cytokínový receptor	rs2073618, rs3134069	8	2	kaukazoidná - slovinská	CA haplotyp zvyšuje riziko	Ramuš a kol., 2013
PON1	paraoxonáza 1	bunkový antioxidant – inhibícia oxidácie HDL	rs662 (p. Q192R)	7	2	multietnická	nekonzistentné zistenia, pravdepodobne neasociovaný	Abhary a kol., 2009; Wang a kol., 2013
			rs854560 (p. L55M)	7	1 a 2	multietnická	asociovaný	Wang a kol., 2013

PON2	paraoxonáza 2	bunkový antioxidant, hydrolytická aktivita	rs7493 (p. S311C), rs12026 (p. A148G)	7	1 a 2	multietnická	nekonzistentné zistenia, pravdepodobne neasociovaný	Wang a kol., 2013
			rs10510419	3	1	afro-americká	asociovaný s progresiou	Roy a kol., 2009; Tariq a kol., 2013
PPARγ	peroxizómovým proliferátorom aktivovaný receptor γ	jadrový receptor – regulácia ukládania mastných kyselín a glukózový metabolizmus, úloha vo vaskulárnej permeabilite, zápale, angiogenéze, neovaskularizácii a inzulínovej rezistencii	rs1801282 (c. C34G, p. P12A)	3	1 a 2	poľská, čínska, dánska, multietnická	G alela protektívny účinok v kaukazoidnej populácii, ale zistenia nekonzistentné	Luo a kol., 2013; Tariq a kol., 2013; Thorsen a kol., 2015; Zhang a kol., 2015
			rs10510419	3	1	afro-americká	asociovaný s progresiou	Roy a kol., 2009; Tariq a kol., 2013
PSMD9	proteazómová podjednotka 6S	súčasť proteazómu	rs74421874, rs14259, rs3825172	12	2	talianska	asociované	Gragnoli, 2011
Romo-1	modulátor reaktívnych foriem kyselika 1	mitochondriálny membránový proteín – zvyšovanie ROS v bunkách	rs6060566	20	2	kaukazoidná	rizikový faktor	Petrovič a kol., 2015
RXRA	retinoidný X receptor alfa	jadrový receptor (TF) – aktivácia prostredníctvom kyseliny retinovej (antioxidačné vlastnosti)	rs3132300	9	1	afro-americká	asociovaný s progresiou DR	Chai a kol., 2008; Roy a kol., 2009
RXRG	retinoidný X receptor gama	jadrový receptor (TF) – aktivácia prostredníctvom kyseliny retinovej (antiproliferačné vlastnosti)	rs3818569	9	1	thajská	G alela asociovaná s rozvojom DR	Hsieh a kol., 2011

Gén	Názov génu	Funkcia	Polymorfizmus	Ch.1	DM	Populácia	Komentár – vzťah k DR	Roy a kol., 2009; Ng a kol., 2012
SLC2A1/ GLUT1	solute carrier family 2, member 1	transport glukózy cez membránu	rs841846 (c. A26177G)	1	1 a 2	afro-americká, malajzijská	významná asociácia so závažnou DR, vrdené v malajzijskej populácii	
			rs841853	1	1	malajzijská, multietnická	slabá asociácia	
TGF-β1	transformujúci rastový faktor beta 1	kontrola bunkového rastu, proliferácie, diferenciácie a apoptózy	c. T869C (p. L10P)	19	2	multietnická	protektívny faktor	Abhary a kol., 2009; Liu a kol., 2014
			c. G915C (p. R25P)	19	2	slovenská	silný rizikový faktor	Beřánek a kol., 2002
TCF4/ TCF7L2	transkripčný faktor 4	transkripčný faktor pre viacere gény, vývoj ciev	rs7903146, rs7901695, rs12255372	10	2	kaukazoidná – talianska, čínska, multietnická	asociované, rs7903146 asociovaný v kaukazoidnej populácii	Abhary a kol., 2009; Cicacci a kol., 2012; Luo a kol., 2013; Ding a kol., 2015; Zhang a kol., 2015
TLR4	toll-like receptor 4	rozpoznávanie patogénov a aktivácia vrodenej imunity	rs10759931, rs1927914	9	2	indická, čínska	A, T alely zvyšujú riziko, rs1927914 asociovaný s náchylnosťou Chanov	Balasubbu a kol., 2010; Singh a kol., 2014
UCP1	uncoupling protein 1	mitochondriálny aniónový proteínový nosič, obrana pred oxidačným stresom	rs1800592 (c. A-3826G)	4	1 a 2	brazilska, čínska, dánska	G alela asociovaná so zvýšeným rizikom PDR	Brondani a kol., 2012; Thorsen a kol., 2015; Zhang a kol., 2015

UCP2	uncoupling protein 2	mitochondriálny aniónový proteínový nosič, kontrola produkcie ROS	rs660339 (p. A55V, 45 bp INS/DEL10)	11	1 a 2	brazilska	rizikový faktor PDR	Roy a kol., 2009; Crispim a kol., 2010
VDR	receptor pre vitamín D	nukleárny receptor pre vitamín D3 asociovaný so sekreciou inzulínu, antiproliferačný a antiangiogenický účinok, regulátor apoptózy	rs10735810 rs2228570 rs1544410	12 12 12	1 a 2 2 2	multietnická Chanovia poľská, kórejská	T alela zvyšuje rizikovo, ale slabá asociácia T alela zvyšuje riziko protektívny účinok v kórejskej populácii	Abhary a kol., 2009 Zhong a kol., 2015 Cyganek a kol., 2006; Hong a kol., 2015
CHN2-CPVL	chimerin 2 - karboxypeptidáza	regulácia bunkového rastu, proliferácia a migrácia - karboxypeptidáza, neznáma úloha v DR	rs39059 rs1002630	7 7	2 2	čínska thajská	zvyšuje riziko, štatisticky významná asociácia v meta-analýze asociovaný s DR a NPDR	Roy a kol., 2009; Hu a kol., 2011 Chen a kol., 2014
ERBB3/HER3	receptor 3 pre ľudský epidermálny rastový faktor	kináza – aktivácia signálnej dráhy, neznáma úloha v DR	rs2292239	12	1	dánska	T alela asociovaná so zníženým rizikom progresie PDR	Thorsen a kol., 2015
FRMD3	proteín 3 obsahujúci FERM doménu	udržiavanie bunkového tvaru, možný TSG, neznáma úloha v DR	rs10868025	9	2	čínska	slabá asociácia	Hu a kol., 2011
ROCK2	Rho-asociovaná, proteín kináza 2	kináza – regulácia cytokinézy, kontrakcia hladkého svalstva, formácia aktinových stresových vlákien a tokálnych adhézií	p. T431N, p. R83K	2	1 a 2	turecká	bez asociácie	Abhary a kol., 2009; Demiryurek a kol., 2010

Tab. 2 Kandidátne gény nesúce polymorfizmus asociovaný s diabetickou retinopatiou (DR - diabetická retinopatia, DM - diabetes mellitus, zvýraznené gény asociované aj s progresiou DR) (Roy a kol., 2009)

Gén	Názov génu	Funkcia génu	Polymorfizmus	Chromozóm	Typ DM
ANGPT1	angiopoietín 1	angiogenéza	rs1283649	8	1
BBS2	Bardet-Biedl syndróm 2 protein	neznáma funkcia a prepojenie s DR	rs4784675	16	1
DRD2	dopaminový receptor D2	dopaminový receptor – regulácia vazodilatácie, produkcie aldosterónu a inzulínová sekrecia	rs7131056	11	1
ENPP1	ektonukleotidová pyrofos- fátaza/fosfodiesteráza 1	inzulínová rezistencia, interakcia s integrínmi	rs1409181	6	1
FLT1/ VEGFR1	FMS-podobná tyrozínkináza 1/ receptor pre vaskulárny endotelový rastový faktor	kontrola bunkovej proliferácie a diferenciácie	rs622227	13	1
HLA-B	hlavný histokompatibilný komplex, trieda I, B	regulácia imunitného systému – prezentácia pepti- dov na bunkovom povrchu	rs2523608	6	1
HTR1B	serotonínový receptor 1B	GPCR pre serotonín – regulácia uvoľňovania sero- tonínu, dopamínu a acetylcholínu, možný regulátor retinálneho krvného toku	rs1228814	6	1
PROS1	protein S	kofaktor antikoagulačnej proteázy, neznáme prepo- jenie s DR	rs13062355	3	1
ROBO2	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2	navigovanie axónov a bunková migrácia, neznáma súvislosť s DR	rs10865559	3	1
SLC2A1/ GLUT1	solute carrier family 2, member 1	membránový transport glukózy	rs841846 (c. A26177G)	1	1 a 2

Tab. 3 Kandidátne gény nesúce polymorfizmus asociovaný s progresiou DR. ECM - extracelulárny matrix, LDL - nízkodenzitný lipoproteín, DR - diabetická retinopatia, DM - diabetes mellitus. (zvýraznené gény asociované aj so vznikom DR - tab. 2, podčiarknuté gény zahrnuté aj v tabuľke 1) (Roy a kol., 2009)

Gén	Názov génu	Funkcia génu	SNP	Chromozóm	Typ DM
<i>CAT</i>	<i>kataláza</i>	antioxidačné vlastnosti	rs566979	11	1
<i>FLT1/VEGFR1</i>	<i>FMS-podobná tyrozínkináza 1/ vaskulárny endotelový rastový faktor</i>	kontrola bunkovej proliferácie a diferenciácie	rs622227	13	1
<i>HLA-B</i>	<i>hlavný histokompatibilný komplex, trieda I, B</i>	regulácia imunitného systému – prezentácia peptidov na bunkovom povrchu	rs2523608	6	1
<i>INSR</i>	<i>inzulínový receptor</i>	aktivácia inzulínovej signálnej dráhy	rs10500204	19	1
<i>ITGB5</i>	<i>integrín β5</i>	interakcie buniek navzájom a s ECM	s9865359	3	1
<i>QLR1</i>	<i>receptor 1 pre oxidovaný LDL (podobný lektínovému typu)</i>	zápalové procesy, regulácia LDL proteínu, možný regulátor Fas spúšťanej apoptózy, asociovaný s hypertenzným vaskulárnym poško- dením, nejasné prepojenie s DR	rs2742115	12	1
<i>PLA2G4A</i>	<i>fosfolipáza A2, skupina IVA</i>	zápalové procesy, nejasné prepojenie s DR	rs932476	1	1
<i>PPARγ</i>	<i>peroxizomový pro- liferátorom aktivovaný receptor γ</i>	nukleárny receptor – regulácia uskladňovania mastných kyselín a metabolizmu glukózy, úloha vo vaskulárnej permeabilite, zápale, angio- genéze, neovaskularizácii a inzulínovej rezistencii	rs10510419	3	1
<i>RXRα</i>	<i>retinoidný X receptor α1a</i>	nukleárny receptor – aktivácia génov sprostredkovaná retinoidnou kyselinou (antioxidačné vlastnosti)	rs3132300	9	1
<i>SLC24A3</i>	<i>solite carrier family 24, member 3</i>	Na-K transportér, nejasné prepojenie s DR	rs2294895	20	1
<i>SLC2A1/ GLUT1</i>	<i>solite carrier family 2, member 1</i>	membránový transport glukózy	rs841846 (c. A26177G)	1	1 a 2
<i>TF</i>	<i>transferín</i>	transport iónov železa, nejasné prepojenie s DR	rs3811647	3	1

Tab. 4 Súhrn genomických regiónov identifikovaných väzbovými štúdiami v možnej asociácii s DR pri DM2. p/ q – veľké/ malé ramienko chromozómu, DR – diabetická retinopatia, NPDR – neproliferatívna DR, PDR – proliferatívna DR (upravené a preložené podľa Looker a kol., 2007; Fu a kol., 2010)

Región	LOD skóre	Typ DR	Populácia	Najbližší genetický marker
1p36	2,58	nešpecifikovaný	Pima Indiáni	D1S3669
1p36	1,24	nešpecifikovaný	mexickí Američania	GGAT2A07
2q27	1,11	závažná NPDR/ PDR	mexickí Američania	AFM112yd4
3p26	1,29	závažná NPDR/ PDR	mexickí Američania	GATA22G12
3q12	2,41	nešpecifikovaný	mexickí Američania	GATA68D03
3q12	1,4	závažná NPDR/ PDR	mexickí Američania	GATA68D03

3q26	1,36	nešpecifikovaný	Pima Indiáni	D3S3053, D3S2427
7p15	1,02	nešpecifikovaný	mexickí Američania	GATA41G07
9q21	1,46	nešpecifikovaný	Pima Indiáni	D9S1120, D9S910
12p13	2,47	nešpecifikovaný	mexickí Američania	GATA49D12
12q23	1,03	závažná NPDR/ PDR	mexickí Američania	GATA85A04
15q25	1,07	nešpecifikovaný	mexickí Američania	ATA28G05
15q26	1,16	nešpecifikovaný	mexickí Američania	GATA22F01

Tab. 5 Súhrn SNP identifikovaných celogenómovými asociačnými štúdiami (GWAS) v súvislosti s DR (DM – diabetes mellitus, DM2 – DM typu 2, DR – diabetická retinopatia, PDR – proliferatívna DR, NPDR – neproliferatívna DR, SNP – jednoduché nukleotidové polymorfizmus)

Štúdia	Populácia	Typ diabetu	Typ DR	SNP	Chromozóm	Lokalizácia
Fu a kol. (2010)	mexickí Američania	T2DM	NPDR a PDR	rs2300782	5	intrón <i>CAMK4</i>
				rs10519765	15	intrón <i>FMN1</i>
				rs2811893	1	intrón <i>MYSM1</i>
Huang a kol. (2011)	thajská	T2DM	NPDR a PDR	rs4470583	4	intergénový región
				rs17376456	5	intrón <i>KIAA0825</i>
				rs12219125	10	<i>PLXDC2</i>
				rs4838605	10	intrón <i>ARHGAP22</i>
				rs4462262	10	intergénový región
				rs2038823	13	intrón <i>HS6ST3</i>

Grassi a kol. (2014)	kaukazoidná	T1DM	PDR a DME	rs476141	1	intergénový región - dlhá nekódujúca RNA (LOC339529)
				rs13064954	3	<i>LEKRI/CCNL1</i>
				rs9866141	3	intergénový región
Sheu a kol. (2013)	thajská, hispánska	T2DM	PDR	rs4787008	16	<i>RFXO1</i>
				rs4865047	4	intrón <i>CEP125</i>
				rs1902491	4	intergénový región
				rs4668142	2	intergénový región
Awara a kol. (2015)	japonská	T2DM	NPDR a PDR	rs2380261	2	intergénový región
				rs9543976	13	<i>UCHL3</i>
Jensen a kol. (2013)	kaukazoidná	-	mierna DR bez DM	rs9362054	6	<i>RP1-90L14.1</i>
				rs12155400	7	intrón <i>HDAC9</i>

GENETICKÉ ASPEKTY DIABETICKEJ RETINOPATIE

Spracovala a vydala spoločnosť
© **MEDIREX** GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava 2016

Korigovali autorky

Grafické spracovanie morrow creative, s.r.o.

Táto monografia vznikla za podpory grantu Centrum výskumu závažných ochorení a ich komplikácií, ITMS 26240120038, Operačný program výskum a vývoj 2013/4.1/04-SORO.

Rozsah 136 strán, 6,7 AH, prvé vydanie, náklad 100 výtlačkov

ISBN 978-80-972434-5-6



Prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD. sa od roku 1993 aktívne podieľa na zabezpečovaní pedagogického procesu na Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK v Bratislave. Je profesor vo vednom odbore 4.2.1 biológia. Aktuálne pracuje ako vysokoškolský pedagóg a zároveň vykonáva funkciu zástupcu prednostu ústavu. Jej najväčším prínosom pre LF UK je zavedenie molekulovej biológie do výučby. Vybudovala a vedie laboratórium molekulovej biológie, v ktorom zaviedla mnohé metódy na úrovni DNA na diagnostiku nádorových a dedičných chorôb.



Mgr. Petra Priščáková v roku 2014 ukončila štúdium na Prírodovedeckej fakulte v odbore genetika. V súčasnosti je interným doktorandom na Ústave lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK v Bratislave v odbore Patologická anatómia a súdne lekárstvo. Zaoberá sa genetickými aspektami multifaktoriálnych ochorení.



9 788097 243456

ISBN 978-80-972434-5-6