

На правах рукописи

ИСХАКОВА АЛЬФИЯ ГУМЯРОВНА

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

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Саратов-2023

Работа выполнена в частном учреждении образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз».

Научный руководитель:

Павлова Ольга Николаевна, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Брындина Ирина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия»; кафедра патологической физиологии и иммунологии; заведующий кафедрой;

Субботина Татьяна Игоревна, доктор медицинских наук, доцент; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тулский государственный университет»; кафедра общей патологии; заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «29» июня 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.066.01 при ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского Минздрава России по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского Минздрава России по адресу: г. Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, 6/9, к. 5 и на сайте организации <http://www.sgmu.ru/sci/dissov>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

А.И. Осколкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРАСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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

По данным Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, представляющая наибольшую угрозу зрению пролиферативная ДР присутствует у 50 % пациентов с длительностью СД 1-го типа 20 лет и более. При СД 2-го типа, составляющем 90–95 % всех случаев этого заболевания, в связи с поздней диагностикой признаки ДР выявляются в момент установления диагноза «сахарный диабет» в 15–30 % случаев, через 10 лет – в 50–60 %, а через 30 лет – более чем у 90 % больных [Трахтенберг Ю.А. и др., 2006; Балашевич Л.И., 2012; Бездетко П.А., 2016].

Длительность диабета и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии ДР. Однако эти факторы сами по себе не объясняют возникновение сосудистых осложнений. Кроме того, у ряда пациентов с плохим гликемическим контролем даже за длительный период диабета ретинопатия не развивается, в то время как у некоторых пациентов с хорошим гликемическим контролем ретинопатия развивается уже в течение нескольких лет. Соответственно, можно предположить наличие влияния генетических факторов в развитии ДР [DCST Research Group, 1997]. В этом аспекте изучение генетических маркеров ДР имеет особую значимость в плане прогнозирования патологии и выделения групп риска на доклиническом этапе, когда профилактические меры имеют высокую эффективность действия.

Актуальные на данный момент методы исследования генетической предрасположенности основаны на изучении полиморфных маркеров генов-кандидатов, продукты экспрессии которых участвуют в формировании определенных патологий. Ретинопатия, как многофакторная патология, имеет полигенный характер и требует оценки комплексной генетической панели. Так, по мнению отечественных и зарубежных авторов, полиморфизмы гена альдозоредуктазы (AKR1B1) ((A-C)_n и rs759853), кодирующего альдозоредуктазу, и ген фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (rs2010963), кодирующего фактор роста эндотелия сосудов, являются наиболее значимыми наследственными факторами, предрасполагающими к развитию ДР среди всех описанных генов. Также описаны три полиморфизма гена эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3): rs1799983, rs41322052 и rs3138808 [Abhary S. et al., 2009; Bragge P., Gruen R.L., Chau M., 2011; Yau J.W.Y et al., 2012].

Наиболее изученным является полиморфизм rs3138808. Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента (ACE), впервые описанный В. Rigat и соавт. (1990), представляющий собой вставку (I) или удаление 287 bp последовательности в 16 интроне, также ассоциирован с развитием ДР. Массовых исследований генетических маркеров, связанных с ретинопатией, ранее не проводилось.

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

Задачи исследования:

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

2. Изучить распределение аллелей и генотипов комплекса полиморфных маркеров генов-кандидатов развития ретинопатии: сосудистого эндотелиального фактора роста, альдозоредуктазы, адренергического бета-3-рецептора, интегрин альфа-2, аполипопротеина E – в группах пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и определить наличие ассоциации полиморфных маркеров данных генов-кандидатов с риском развития диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2-го типа.

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

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

Научная новизна

Впервые изучена роль генетических факторов в развитии ретинопатии при СД 2-го типа на основе полигенного молекулярно-генетического исследования потенциальных генов-кандидатов: сосудистого эндотелиального фактора роста, альдозоредуктазы, адренергического бета-3-рецептора (ADRB3), интегрин альфа-2 (ITGA2), аполипопротеина E (APOE). Впервые разработана диагностическая панель информативных генетических маркеров для прогнозирования риска развития ДР при СД 2-го типа. Впервые разработана программа-калькулятор (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» № 2022614737), позволяющая прогнозировать у пациентов с СД 2-го типа развитие и течение ДР. На основе использования программы врач-офтальмолог может разрабатывать наиболее эффективные тактики ведения пациентов, исходя из их индивидуальных офтальмологических, эндокринологических и молекулярно-генетических показателей.

Теоретическая и практическая значимость

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

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

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

Комплексный персонализированный подход, включающий функциональную, офтальмологическую и эндокринологическую диагностику (в том числе исследование крови на гликированный гемоглобин, глюкозу, триглицериды и холестерин), повышает эффективность прогноза развития ДР за счет научно обоснованного расчета с помощью разработанной программы – калькулятора степени риска на основании широкого спектра клинически значимых показателей, влияющих на развитие либо сопровождающих микрососудистые поражения сетчатки, что, в свою очередь, обеспечит возможность оказания своевременных профилактических мероприятий. Внедрение в схему диагностики ДР молекулярно-генетического тестирования пациентов предоставит возможность выявлять наследственные маркеры предрасположенности к развитию ДР у пациентов с СД 2-го типа и определять тактику их лечения.

Перечисленные причины обуславливают научный и практический интерес к повышению эффективности прогноза развития ДР на основе комплексного персонализированного подхода, включающего систему генетического скрининга, функциональные исследования сетчатки и эндокринологическую диагностику у больных СД.

Методология и методы исследования

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

В работе применяли следующие методы исследования: общеклиническое обследование (офтальмологический осмотр и анализ биохимических показателей крови), позволяющее характеризовать основные клинические факторы развития осложнений при СД 2-го типа, и специальные методы – амплификацию полиморфных участков исследуемых генов при помощи полимеразной цепной реакции с последующим изучением различий в частотах распределения отдельных аллелей / генотипов исследуемых полиморфных маркеров у лиц с наличием и отсутствием ДР. Полиморфные маркеры определяли электрофорезом на гелях и в режиме реального времени – Realtime ПЦР.

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

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенности распределения аллелей и генотипов комплекса полиморфных маркеров генов-кандидатов развития ретинопатии: VEGF, AKR1B1, ADRB3, ITGA2, APOE – в группах пациентов с СД 2-го типа.
2. Диагностическая модель информативных генетических маркеров для прогнозирования развития ДР.
3. Программа «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» – основа прогнозирования течения ДР и тактики ведения пациентов с СД 2-го типа.

Степень достоверности представленных данных

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

Статистический анализ данных выполняли в среде пакета IBM SPSS 21. Для сравнения количественных признаков применяли критерий Манна – Уитни – Вилкоксона. Для сопоставления частот генотипов с наличием ДР – критерий хи-квадрат Пирсона (χ^2) и рассчитывали отношение шансов и его 95 % доверительный интервал. Для разработки прогностической модели риска развития ретинопатии использовали множественную логистическую регрессию. Качество прогнозирования оценивали с помощью ROC-кривых (receiver operating characteristic). Для выделения мультилокусных генотипов применяли метод MDR (multifactor dimensionality reduction), реализованный в программном продукте MDR software (version 3.0.2).

Апробация работы

Материалы, представленные в диссертационной работе, апробированы на Всероссийской конференции, посвященной 110-летию со дня рождения профессора Тихона Ивановича Ерошевского (2012 г.); научно-практической конференции «Рефракционные вопросы» (2019 г.); XIV офтальмологической конференции «Рефракция-2019. Новые горизонты»; научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной офтальмологии» (2019 г.); XIII юбилейной офтальмологической конференции «Рефракция-2018»; научно-практической конференции «Хронические заболевания органа зрения», 2017 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре медико-биологических дисциплин частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз», на кафедре физиологии с курсом безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автором лично и самостоятельно проведен анализ фундаментальной современной литературы по теме диссертации, сформированы группы клинического исследования в количестве, достаточном для получения статистически достоверных

результатов; определен дизайн исследования. Автором самостоятельно проведено офтальмологическое и эндокринологическое обследование пациентов, участвовавших в исследовании, проведена аналитическая и статистическая обработка полученных данных, на основе которых сделаны достоверные и обоснованные обобщения и выводы; оформлены автореферат и диссертация.

Публикации результатов диссертационного исследования

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 4 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в журнале, индексируемом медицинской базой данных Scopus, 1 статья в журнале, индексируемом в базе данных Web of Science, 1 патент РФ (Пат. 2629041 Российская Федерация, МПК А61F 9/008 (2006.01) А61В 8/13 (2006.01). Способ лазерного лечения диабетического макулярного отека); 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2022614737 «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии».

Структура и объем работы

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клинические исследования проводились на базе ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского». Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и анализ полиморфных маркеров генов осуществлялись на базе ООО «ТестГен» (г. Ульяновск). Исследование одобрено этическим комитетом частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» № 493 от 02 февраля 2015 г.). Всего в исследование были включены 475 пациентов. Материалом для исследований явились пробы венозной крови, полученные от пациентов, больных СД 2-го типа, прошедших офтальмологический и эндокринологический осмотры.

Объект исследования – ДНК пациентов с СД 2-го типа.

Предмет исследования – полиморфизмы генов – кандидатов развития ДР в ДНК пациентов с СД 2-го типа.

Критериями включения пациентов в исследование служили следующие факторы: наличие СД 2-го типа; длительность заболевания – 10 лет и более от момента постановки диагноза; возраст старше 18 лет; наличие подписанного пациентом информированного согласия на участие в научном исследовании; заключения по результатам офтальмологического осмотра; результатов анализов крови на гликированный гемоглобин и глюкозу.

Критерии исключения пациента из исследования: СД 1-го типа; хронические соматические заболевания в стадии декомпенсации; заболевания сетчатки, затрудняющие диагностику ДР.

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

В работе применяли следующие методы исследования: общеклиническое (офтальмологический осмотр и анализ биохимических показателей крови) и молекулярно-генетический анализ (анализ полиморфных маркеров генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени). Дизайн исследования представлен на рис. 1.

Из 475 пациентов было 79 мужчин и 396 женщин, обратившихся за медицинской помощью в период с 2015 по 2018 год. Возраст обследованных составил от 24 до 89 лет, в среднем $64,4 \pm 9,6$ года. Этнический состав обследованных: 84 % – русские, 3,5 % – татары, 2 % – башкиры, 3,6 % – мордва, 2,1 % – чувашаи, 4,8 % – пациенты из восточнославянской популяции Поволжья. У 2 % пациентов с отсутствием ДР установлено наличие тракционного макулярного отека, что является предиктором развития ДР. У 25 % пациентов с непролиферативной стадией ДР наблюдался экссудативный отек, у 2 % – тракционный макулярный отек и у 1 % – смешанный. У 61 % пациентов с препролиферативной ДР отмечался экссудативный отек, 4 % – тракционный и 9 % – смешанный макулярный отек. Пациенты с пролиферативной ДР в 49 % случаев имели экссудативный отек, 6 % – тракционный и 3 % – смешанный макулярный отек. Установлено, что у пациентов с отсутствием ДР в 11,80 % случаев наблюдается сухая форма возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и в 1,10 % – влажная форма ВМД. При этом влажная форма ВМД наблюдалась только у больных с отсутствием ДР и с пролиферативной стадией ДР (0,6 %). У пациентов с непролиферативной стадией ДР в 11,0 % случаев наблюдается сухая форма ВМД, у больных с препролиферативной стадией ДР – в 4,3 % случаев и с пролиферативной стадией – в 9,9 %.

Объективное обследование пациентов включало сбор жалоб, анализ анамнестических данных, осмотр, антропометрическое обследование, измерение артериального давления. Для каждого пациента проводили расчет индекса массы тела. Пациенты были осмотрены офтальмологом и эндокринологом. В ходе офтальмологического исследования проводился стандартный офтальмологический осмотр, офтальмоскопия и стереоскопическое фотографирование с помощью фундус-камеры семи стандартных полей сетчатки. Результаты оценивали по шкале Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). В ходе эндокринологического осмотра определяли тип, стаж и вид терапии СД, а также проводили стандартное лабораторное исследование на базе лаборатории «In vitro» Самара (договор от 9 февраля 2015 года № 025), которое включало следующее: определение уровня общего холестерина; уровня триглицеридов; уровня глюкозы; анализ крови на гликированный гемоглобин.

Отбор проб венозной крови проводился на базе ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского». Венозную кровь забирали в объеме 5–8 мл. Для забора использовали стерильные пробирки, содержащие CPDA, в качестве антикоагулянта – смесь лимонной кислоты, фосфата натрия, декстрозы и аденина (производитель Greiner-Bio-One, Австрия). Выделение и очистку геномной ДНК для последующего проведения ПЦР осуществляли из цельной крови набором «ДНК-Кровь-М» (производства ООО «ТестГен», г. Ульяновск), методом обратимой адсорбции ДНК на магнитных частицах. Для проведения амплификации участков генов-кандидатов, содержащих полиморфные маркеры, были использованы

олигонуклеотидные праймеры. Для построения кривых плавления – флуоресцентно-меченные зонды. Олигонуклеотиды подбирались на основании данных NCBI GeneBank. Праймеры и зонды были синтезированы ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва).

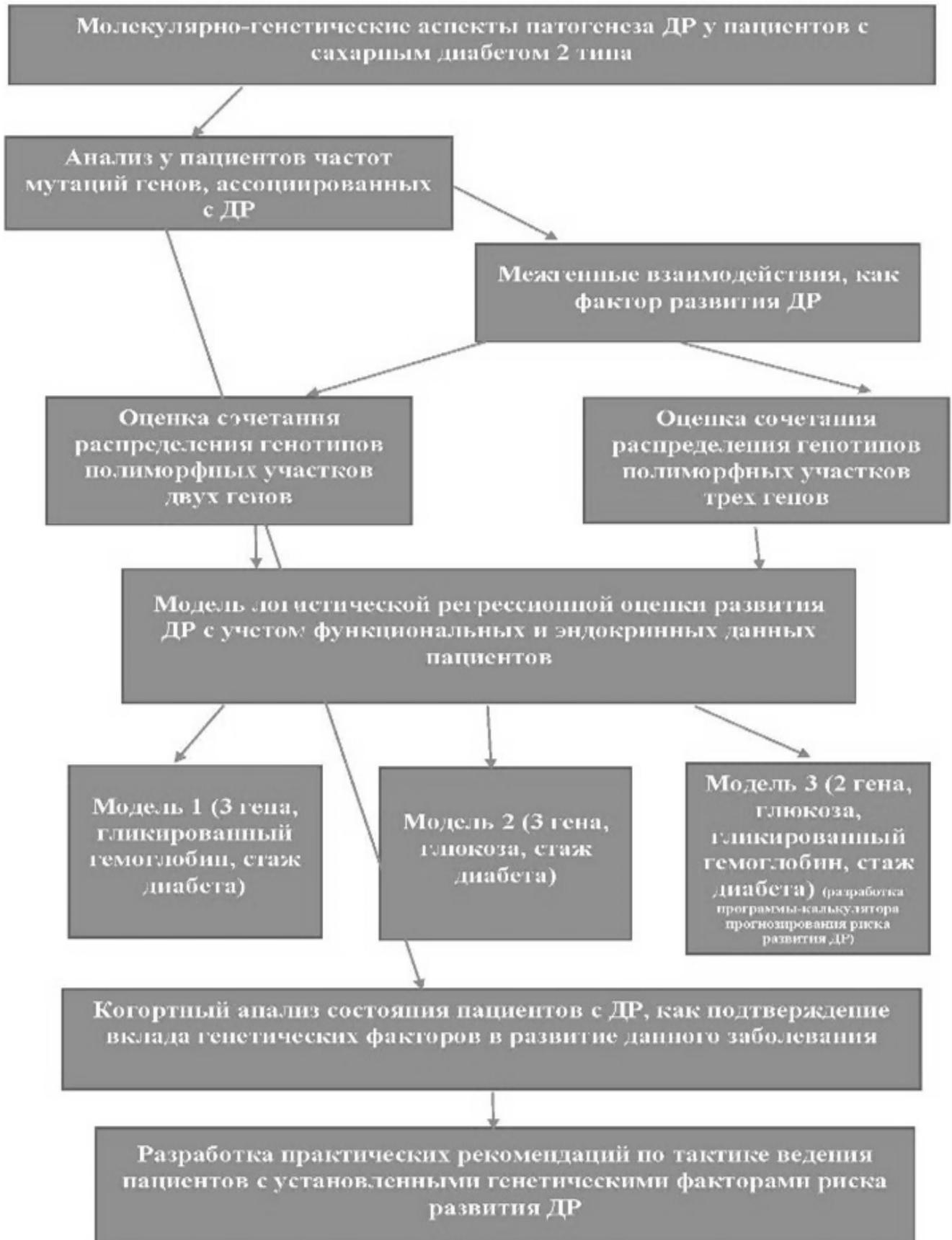


Рис. 1. Дизайн исследования

Для амплификации применяли Taq ДНК-полимеразу с горячим стартом, 10x Taq Turbo буфер; для амплификации GC-богатых регионов – Encyclo полимеразу и набор реактивов «Encyclo Plus PCR kit», а также dNTP производства ЗАО «Евроген» (г. Москва). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на амплификаторе DTprime (ООО «ДНК-Технология», г. Москва), в объеме реакционной смеси – 20 мкл. Проверку качества и термодинамический анализ выбранных праймеров выполняли с помощью программы OLIGO DNA/RNA primer analysis software, v.5.0 и BLAST (USA).

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

Для выделения мультилокусных генотипов, то есть сочетаний генотипов по различным генам, ассоциированных с большим или меньшим риском ретинопатии, воспользовались методом MDR, реализованным в программном продукте MDR software (version 3.0.2).

Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Результаты проведенного исследования и их обсуждение. Пациенты с различными стадиями ДР достоверно отличались по остроте зрения правого (OD) и левого (OS) глаза от пациентов без ДР. У пациентов с непролиферативной стадией ДР OD была ниже, чем у пациентов с отсутствием ДР, в среднем на 13,2 %, у пациентов с препролиферативной стадией ДР – ниже на 32,9 % и с пролиферативной стадией – ниже на 42,1 %.

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

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

Сравнение изучаемых групп пациентов показало, что у больных с наличием ДР отмечалась более высокая концентрация глюкозы и гликированного гемоглобина по сравнению с группой с ее отсутствием, а также более длительный стаж СД.

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

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

У пациентов с непролиферативной стадией ДР концентрация гликированного гемоглобина была $8,65 \pm 0,18$ %, с препролиферативной стадией ДР – $8,58 \pm 0,34$ %, а

при пролиферативной стадии ДР – $8,90 \pm 0,19$ %, что достоверно отличалось ($p < 0,001$, $p < 0,015$, $p < 0,001$ соответственно) от показателей пациентов без ДР (концентрация гликированного гемоглобина $7,37 \pm 0,09$).

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

У пациентов с непролиферативной стадией ДР средний стаж диабета был $14,47 \pm 0,78$ года, с препролиферативной стадией ДР – $15,19 \pm 1,78$ года, а при пролиферативной стадии ДР – $18,14 \pm 0,91$ года, что достоверно отличалось ($p < 0,001$, $p < 0,014$, $p < 0,001$ соответственно) от данных пациентов без ДР (стаж диабета $8,94 \pm 0,43$ года).

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

С помощью флюоресцентной ангиографии глазного дна и оптической когерентной томографии-ангиографии установлены микрососудистые изменения в макулярной зоне при СД 2-го типа даже на самых ранних стадиях заболевания, когда на глазном дне еще отсутствуют проявления ДР. Установлено, что наиболее ранним маркером изменений микроциркуляторного русла сетчатки при СД являются качественные и количественные изменения в фовеальной аваскулярной зоне, которые выявляются еще на доклинических стадиях развития ДР и увеличиваются по мере прогрессирования заболевания, а также снижение плотности капиллярной сети поверхностного сосудистого сплетения.

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

При исследовании гена VEGF rs2010963 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке не соответствует равновесию Харди – Вайнберга у пациентов ни с наличием, ни с отсутствием ДР, ни среди всех обследованных. Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: CC – 152 человека (32,0 %), GC – 191 (40,2 %) и GG – 132 (27,8 %). Это соответствует частотам аллелей C – 52,1 % и G – 47,9 % и, следовательно, теоретическому распределению генотипов CC/GC/GG – 27,2 % / 49,9 % / 22,9 %, что статистически значимо отличается от наблюдаемых частот ($\chi^2 = 17,9$, $p < 0,001$). Меньшая почти на 10 %, чем теоретически ожидаемая, частота гетерозигот по гену VEGF в изучаемой группе больных, на наш взгляд, может быть связана с неслучайным отбором генотипов при формировании изучаемых групп больных СД из общей популяции.

При исследовании генов ADRB3 rs4994, ITGA2 rs2910964, AKR1B1 rs759853 и двух участков гена APOE (rs7412 и rs429358) установлено, что распределение генотипов в изучаемых участках соответствует равновесию Харди – Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

При исследовании гена ADRB3 rs4994 наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: TT – 380 человек (80,0 %), TC – 93 (19,6 %) и CC – 2 (0,4 %). Это соответствует частотам аллелей T – 89,8 % и C – 10,2 % и, следовательно, теоретическому распределению генотипов TT/TC/CC – 80,6 % / 18,3 % / 1,1 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

При исследовании гена ITGA2 rs2910964 наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: CC – 166 человек (34,9 %), CT – 231 (48,6 %) и TT – 78 (16,4 %). Это соответствует частотам аллелей C – 59,2 % и T – 40,8 % и, соответственно, теоретическому распределению генотипов CC/CT/TT – 35,0 % / 48,3 % / 16,7 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот. Следует отметить, что взаимосвязи генотипов по данному гену не выявлено во всех вариантах рассмотрения при $p \gg 0,005$.

При исследовании гена AKR1B1 rs759853 наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: GG – 177 человек (37,3 %), GA – 227 (47,8 %) и AA – 71 (14,9 %). Это соответствует частотам аллелей G – 61,2 % и A – 38,8 % и, следовательно, теоретическому распределению генотипов GG/GA/AA – 37,5 % / 47,55 % / 15,0 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

При исследовании участка rs7412 гена APOE установлено, что наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: CC – 398 человек (83,8 %), CT – 73 (15,4 %) и TT – 4 (0,8 %). Это соответствует частотам аллелей C – 91,5 % и T – 8,5 %, а значит, и теоретическому распределению генотипов CC/CT/TT – 83,7 % / 15,6 % / 0,7 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

При исследовании участка rs429358 гена APOE установлено, что наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: TT – 364 человек (76,6 %), TC – 106 чел. (22,3 %) и CC – 5 чел. (11 %). Это соответствует частотам аллелей T – 87,8 % и C – 12,2 % и соответственно теоретическому распределению генотипов TT/TC/CC – 77,1 % / 21,4 % / 1,5 %, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

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

Отсутствие статистически значимых взаимосвязей между отдельными генотипами в полиморфных участках генов определило дальнейший поиск межгенных взаимодействий, которые могли бы увеличить или, наоборот, снизить риски развития ДР. Для поиска благоприятных и неблагоприятных комбинаций генов использовали метод MDR, который позволяет выбирать наиболее тесно связанные с исходом сочетания генов и генотипов. Для прогнозирования риска развития ДР классификатором было предложено два варианта: по сочетанию двух генов и трех генов.

Первоначально программой было вычленено сочетание распределения генотипов полиморфных участков генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853. Установлено, что сочетания гомозиготы по более редкому варианту гена AKR1B1 с гетерозиготой по редкому варианту гена VEGF (57 %) или гомозиготой гена VEGF (50 %) имеются у пациентов с наличием ДР. И наоборот, реже всего ДР развивалась у носителей «диких» вариантов полиморфизмов по двум генам одновременно: VEGF и AKR1B1 (30 % пациентов с ДР). Невысокие частоты ДР также наблюдали и при одновременном сочетании двух гетерозиготных вариантов генов VEGF и AKR1B1 (37 %). При оценке качества данного прогноза было установлено, что точность метода составляет 55,6 %, чувствительность – 59,6 %, специфичность – 52,6 %, ОШ 1,64 (1,13–2,36); $\chi^2 - 6,917$ ($p = 0,0085$); χ^2 (попр. Йетса) – 6,437, ($p = 0,011$); Кappa – 0,12.

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

Так как оба участка гена APOE (rs7412 и rs429358) рассматривались вместе, мы ввели кодирование сочетаний генотипов (табл. 1).

Таблица 1

Обозначение нуклеотидами объединенных участков гена APOE

APOE rs7412	APOE rs429358	APOE объединенный
T/T	T/T	e2e2
C/T	T/T	e2e3
C/C	T/T	e3e3
C/C	T/C	e3e4
C/C	C/C	e4e4
C/T	T/C	Гетерозиготы

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

В ходе анализа установлено, что некоторые сочетания генотипов участков трех генов определяют 100 % вероятность развития ДР:

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

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

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

6) сочетание гомозиготы по дикому типу VEGF с гомозиготой по дикому типу AKR1B1 и объединенного гена APOE e2e2;

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

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

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

На основе установленных данных нами были получены три устойчивые модели, включающие выработанные программой MDR комбинации генотипов (две модели с сочетанием трех генотипов и одна модель с сочетанием двух генотипов), стаж СД и уровень гликемии, оцененный либо по гликированному гемоглобину, либо по уровню глюкозы (табл. 2).

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

Таблица 2

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

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

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

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

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

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

Анализ 1-й модели логистической регрессии с помощью ROC-анализа представлен в табл. 3, анализ 2-й – в табл. 4, анализ 3-й модели – в табл. 5.

Таблица 3

ROC-анализ первой модели логистической регрессии

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

Таблица 4

ROC-анализ второй модели логистической регрессии

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

Представленные данные свидетельствуют, что каждый из возможных факторов риска обладает худшими прогностическими способностями, нежели модель с их учетом. У модели 2 $AUC = 0,812$ (95 % ДИ: 0,773–0,850).

Таблица 5

ROC-анализ третьей модели логистической регрессии

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

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

При анализе третьей модели установлена аналогичная тенденция: каждый из возможных факторов риска также обладает худшими прогностическими способностями, нежели модель с их учетом. У модели 3 $AUC = 0,814$ (95 % ДИ: 0,774–0,855). Исходя из сказанного ранее, мы решили взять за основу модель 3, сочетающую два генотипа, а также стаж СД, концентрацию глюкозы и гликированного гемоглобина в крови. Провели сравнительный анализ прогностических возможностей этой модели с суммой клинико-лабораторных данных анамнеза пациентов без генетического аспекта (табл. 6).

По данным, представленным в табл. 6, видно, что модель 3 с учетом генетических факторов имеет площадь чуть больше (на 0,025), чем модель только с совокупностью клинико-лабораторных данных анамнеза пациента (0,814 и 0,789 соответственно). Данная разница в показателях статистически значима. Таким образом, установлено, что стаж СД, концентрация глюкозы и гликированного гемоглобина в крови – это важные факторы, способствующие возникновению ДР, но с помощью сравнительного ROC-анализа подтверждено, что генетические факторы вносят статистически значимый вклад в развитие данной патологии и обуславливают ее возникновение у больных с компенсированным СД 2-го типа.

Таблица 6

Сравнительный ROC-анализ третьей модели логистической регрессии с совокупностью клинико-лабораторных данных анамнеза пациентов

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

Для полноты исследования было решено провести анализ ухудшения стадии ДР у пациентов в течение года. Среди группы пациентов с отсутствием ДР у 39 человек установлено ухудшение зрения и появление ДР. В целом всего у 47 человек ухудшилась стадия ДР. Ухудшение стадии ДР происходило в основном на одну градацию, и лишь у одного пациента сразу из непролиферативной ДР перешла в пролиферативную стадию. Установлено, что изменения баллов по ETDRS (Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study) у пациентов в зависимости от стадии ДР происходили неравномерно, но статистически значимо. Так, в группе больных с отсутствием ДР увеличилось баллов у 16,0 % пациентов, в группе с непрепролиферативной ДР – у 59,0 % больных, в группе с препролиферативной ДР – у 55,0 %, а в группе с пролиферативной ДР – у 49,0 %, что свидетельствует о прогрессировании ДР. Достоверной взаимосвязи возрастания баллов ETDRS у пациентов с различными генотипами полиморфных генов не установлено, но так как данные по гену AKR1B1 находились на границе статистической значимости, мы провели более детальный анализ и установили, что в случае предположения доминантности 1-го аллеля (G), гомозиготы по более редкому аллелю А статистически значимо повышают риски ухудшения баллов по ETDRS за год (20 % против 13 %), ОШ = 1,69 (95 % ДИ: 1,00–2,83), $p = 0,047$.

Также мы провели оценку прогноза увеличения числа баллов ETDRS у пациентов при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853. Сочетание различных генотипов двух генов дает достоверной прогноз ухудшения баллов ETDRS у пациентов с отсутствием или наличием ДР любой стадии (для неблагоприятного сочетания генотипов ОШ = 2,1 (95 %, ДИ: 1,41–3,14)). Более детальный анализ сочетания генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 и прогноз возникновения ДР представлен в табл. 7.

Таблица 7

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

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

Используя метод MDR, мы установили:

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

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

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

На основании полученных данных мы провели оценку прогноза увеличения баллов ETDRS у пациентов при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853 с учетом риска развития ДР и установили, что при прогнозировании высокого риска, действительно, чаще наблюдалось увеличение количества баллов (27,15 % против 16,35 %, $p = 0,002$, ОШ = 1,91 (1,2–3,04).

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

Особый интерес представляет собой группа больных без ДР: поскольку за год исследования этим пациентам не проводили никакого специфического лечения ДР, то вклад генетических факторов в развитие заболевания может быть более «чистым». Установлена достоверная взаимосвязь возрастания баллов ETDRS у пациентов с различными генотипами полиморфных генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853, и для них мы провели более детальный анализ. Выявили, что у пациентов, гомозиготных по более редкому аллелю гена VEGF rs2010963, с большей вероятностью происходит ухудшение по шкале ETDRS в течение года с ОШ = 2,02 (1,01–4,01), $p = 0,043$. У пациентов, гомозиготных по более редкому аллелю гена AKR1B1 rs759853, с большей вероятностью ухудшаются показатели по шкале ETDRS в течение года с ОШ = 3,46 (1,56–7,68), $p = 0,001$.

Для гена APOE rs429358 установлена взаимосвязь роста числа баллов ETDRS у пациентов с различными генотипами на границе достоверности.

Также мы провели оценку прогноза увеличения количества баллов ETDRS у пациентов без ДР при сочетании различных генотипов генов VEGF rs2010963 и AKR1B1 rs759853. Достоверным оказался только классификатор по двум генам VEGF и AKR1B1 с тремя уровнями риска (табл. 8).

Таблица 8

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

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

На основе совокупности установленных данных и модели 3, а также модели логистической регрессии нами была разработана программа-калькулятор (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» № 2022614737) для прогнозирования риска развития и прогрессирования ДР, которая учитывает сочетание генотипов двух генов у пациентов (VEGF и AKR1B1), концентрацию глюкозы, гликированного гемоглобина и стаж СД. На основе полученных данных программа высчитывает вероятность развития ДР (вероятность более 40 % считается высокой) и позволяет врачу определять наиболее эффективную тактику ведения и терапии пациента с ДР.

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

1. Пациент должен быть осмотрен офтальмологом сразу же (или как можно раньше) после выявления СД.

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

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

4. Офтальмологическое обследование женщин, страдающих СД и пожелавших иметь ребенка, необходимо проводить до зачатия (в период планирования беременности) и каждые 3 месяца после подтверждения беременности. Но если у женщины установлено сочетание генотипов двух генов (VEGF и AKR1B1), с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при вероятности развития ДР ниже 40 % с использованием программы-калькулятора, рекомендовано стандартное офтальмологическое обследование каждые 3 месяца, а при вероятности более 40 % – каждый месяц.

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

I. Независимо от стадии ДР и сопутствующих осложнений всем пациентам рекомендована максимально стабильная компенсация СД, нормализация артериального давления и липидного профиля под контролем врача – эндокринолога-офтальмолога.

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

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

ВЫВОДЫ:

1. Длительность диабета и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии диабетической ретинопатии. Однако возникновение сосудистых осложнений у ряда пациентов с хорошим гликемическим контролем и компенсированным сахарным диабетом, в отличие от пациентов с декомпенсированным заболеванием, вносит вклад в развитие данной патологии ряда генетических факторов. В ходе метаанализа результатов многочисленных исследований, касающихся взаимосвязи между генетическими факторами риска и развитием диабетической ретинопатии, выделено 196 полиморфизмов 20 генов, ассоциированных с развитием диабетической ретинопатии. Полиморфизмы по генам эндотелиальной синтазы оксида азота, альдозоредуктазы, сосудистого эндотелиального фактора роста, интегрин альфа-2, молекулы межклеточной адгезии 1-го типа, адренергического бета-3-рецептора, апополипротеина E ассоциированы с развитием диабетической ретинопатии. Ген альдозоредуктазы имеет наибольшее число полиморфизмов, связанных с диабетической ретинопатией.

2. Полиморфные локусы генов сосудистого эндотелиального фактора роста rs2010963, альдозоредуктазы rs759853, интегрин альфа-2 rs2910964, адренергического бета-3-рецептора rs4994, апополипротеина E rs7412, апополипротеина E 429358, рассматриваемые независимо друг от друга, не связаны с развитием диабетической ретинопатии.

3. Установлено, что при оценке взаимосвязей двух генов сочетания гомозиготы по более редкому варианту гена альдозоредуктазы с гетерозиготой по редкому варианту гена сосудистого эндотелиального фактора роста или гомозиготой гена сосудистого эндотелиального фактора роста наблюдаются у пациентов с наличием диабетической ретинопатии. При оценке взаимосвязей трех генов установлено, что ряд сочетаний генотипов определяют 100 % вероятности развития диабетической ретинопатии: сочетание гетерозиготы сосудистого эндотелиального фактора роста с гомозиготой по редкому типу гена альдозоредуктазы и объединенного гена апополипротеина E $\epsilon 2\epsilon 3$; сочетание гетерозиготы сосудистого эндотелиального фактора роста с гомозиготой по редкому типу альдозоредуктазы и

объединенного гена аполипопротеина E e2e2; сочетание гомозиготы по редкому типу гена сосудистого эндотелиального фактора роста с гетерозиготой гена альдозоредуктазы и объединенного гена аполипопротеина E гетерозиготы; сочетание гомозиготы по дикому типу гена сосудистого эндотелиального фактора роста с гомозиготой по редкому типу гена альдозоредуктазы и объединенного гена аполипопротеина E e2e3; сочетание гомозиготы по дикому типу гена сосудистого эндотелиального фактора роста с гетерозиготой гена альдозоредуктазы и объединенного гена аполипопротеина E e4e4; сочетание гомозиготы по дикому типу гена сосудистого эндотелиального фактора роста с гомозиготой по редкому типу альдозоредуктазы и объединенного гена аполипопротеина E гетерозиготы; сочетание гомозиготы по дикому типу гена сосудистого эндотелиального фактора роста с гомозиготой по редкому типу гена альдозоредуктазы и объединенного гена аполипопротеина E e4e4.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

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

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

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

4. Пациенты с сохраняющимся высоким уровнем гликемии (уровень гликированного гемоглобина > 9 %) и артериальной гипертензией (артериальное давление выше 160/95 мм рт. ст.) должны осматриваться офтальмологом не реже

одного раза в 6–8 месяцев даже при отсутствии патологических изменений на глазном дне при первичном осмотре. Если же у пациента установлено сочетание генотипов двух генов (сосудистого эндотелиального фактора роста и альдозоредуктазы) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при рассчитанной программой-калькулятором вероятности развития диабетической ретинопатии ниже 40 %, то назначается стандартное офтальмологическое обследование не реже одного раза в 6–8 месяцев, а при вероятности более 40 % – каждые 3 месяца.

5. Офтальмологическое обследование женщин, страдающих сахарным диабетом 2-го типа и пожелавших иметь ребенка, необходимо проводить до зачатия (в период планирования беременности) и каждые 3 месяца после подтверждения беременности. Если у женщины установлено сочетание генотипов двух генов (сосудистого эндотелиального фактора роста и альдозоредуктазы) и с учетом концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина и стажа диабета при рассчитанной программой-калькулятором вероятности развития диабетической ретинопатии ниже 40 %, рекомендовано стандартное офтальмологическое обследование каждые 3 месяца, а при вероятности более 40 % – каждый месяц.

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Характеристика микроциркуляторных нарушений у больных сахарным диабетом / А.Г. Исхакова, В.С. Куваев, М.А. Селихова, И.Л. Давыдкин, Е.А. Лебедева // CardioСоматика. – 2011. – Т. 2, № 1/1. – С. 55.

2. Диабетическая ретинопатия: первый опыт работы на базе офтальмологических мобильных комплексов / А.В. Золотарев, А.А. Куличин, А.Г. Исхакова, Н.Ф. Прохоренко // Ерошевские чтения: труды Всерос. конф., посвящ. 110-летию со дня рождения Героя Социалистического Труда, лауреата Государственной премии СССР, засл. деятеля науки РСФСР, чл.-корр. АМН СССР, проф. Тихона Ивановича Ерошевского; под ред. Г.П. Котельникова, Г.Н. Гридасова, В.М. Малова. – Самара, 2012. – С. 301–304.

3. Результаты скрининга и подходы в лечении диабетической ретинопатии на базе мобильного офтальмологического лечебно-диагностического комплекса и офтальмоэндокринологического отделения / А.Г. Исхакова // Аспирантский вестник Поволжья. – 2013. – № 1–2. – С. 151–155.

4. Возможности скрининга диабетической ретинопатии на базе мобильного офтальмологического лечебно-диагностического комплекса / А.Г. Исхакова // Вестник ОГУ. – 2013. – № 4 (153). – С. 108–113.

5. Результаты клинико-экономического анализа лечения больных диабетической ретинопатией с макулярным отеком / А.Г. Исхакова // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2014. – № 1–2. – С. 218–220.

6. Эффективность лазерного лечения больных с диабетическим макулярным отеком / А.Г. Исхакова, А.В. Золотарев, С.А. Суслин // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 126–128.

7. Экономические аспекты лечения диабетического макулярного отека на региональном уровне в Российской Федерации / В.Г. Серпик, Д.Г. Арсютов, Е.Г. Гулидова, А.В. Золотарев, А.Г. Исхакова., А.Ю. Куликов, Р.Р. Файзрахманов, М.Э. Целина, Р.И. Ягудина // **Вестник офтальмологии**. – 2017. – № 6. – С. 138–148.

8. Роль генетических факторов риска в развитии диабетической ретинопатии / А.Г. Исхакова // **Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»**. – 2018. – № 5. – С. 41–50.

9. Роль факторов роста сосудов в развитии диабетической ретинопатии и макулярного отека / А.Г. Исхакова, А.В. Золотарев, Д.А. Викторов, А.Н. Тороповский, А.Г. Никитин // **Российский офтальмологический журнал**. – 2018. – № 11 (2). – С. 62–69.

10. Анализ частоты мутации генов, ассоциированных с диабетической ретинопатией в Поволжской популяции / А.Г. Исхакова, А.Н. Тороповский, А.В. Золотарев, О.Н. Павлова, М.В. Комарова, Д.А. Викторов // **Современные проблемы науки и образования**. – 2019. – № 6. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=29283> (дата обращения: 19.11.2019).

11. Молекулярно-генетические аспекты диагностики диабетической ретинопатии / А.Г. Исхакова // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020: сб. материалов / под ред. В.Г. Акимкина, М.Г. Твороговой. – М.: ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2020. – С. 224.

12. Молекулярно-генетические аспекты ранней диагностики диабетической ретинопатии / А.Г. Исхакова, А.Н. Тороповский, А.В. Золотарев, О.Н. Павлова, М.В. Комарова // **Международный научно-исследовательский журнал**. – 2021. – № 3 (105), ч. II. – С. 79–85.

13. Molecular and genetic aspects of diabetic retinopathy diagnosis / A.G. Iskhakova, A.N. Toropovsky, A.V. Zolotarev, O.N. Pavlova, M.V. Komarova // **Proceedings of the Conference on Health and Wellbeing in Modern Society (CHW 2021)**. – Yakutsk, 2022. – P. 265–272.

14. Оценка взаимосвязи прогрессирования диабетической ретинопатии с генотипами полиморфных генов у пациентов с установленным диагнозом «диабетическая ретинопатия» / А.Г. Исхакова, А.Н. Тороповский, А.В. Золотарев, О.Н. Павлова, М.В. Комарова // **Вестник новых медицинских технологий**. – 2022. – № 6. – С. 70–79.

Пат. 2629041 Российская Федерация, МПК А61F 9/008 (2006.01) А61В 8/13 (2006.01). Способ лазерного лечения диабетического макулярного отека / Золотарев А.В., Куприянов А.В., Ильясова Н.Ю. Исхакова А.Г., Замыцкий Е.А. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2016118974 ; заявл. 16.05.2016 ; опубл. 24.08.2017, Бюл. № 24. – 4 с.

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ RU 2022614737 «Калькулятор для прогнозирования риска развития и прогрессирования диабетической ретинопатии» / Исакова А.Г. Золотарев А.В., Павлова О.Н., Комарова М.В., Замыцкий Е.А. ; правообладатель Исакова Альфия Гумяровна. – № 2022613558 ; заявл. 11.03.2022 ; опубл. 24.03.2022. – Режим доступа: <https://www.fips.ru/registers-web/action?acName=clickTree&nodeId=76&maxLevel=1> (дата обращения 27.04.2023)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВМД – возрастная макулярная дегенерация
ДИ – доверительный интервал
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДР – диабетическая ретинопатия
ОШ – отношение шансов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СД – сахарный диабет
ADRB3 – адренергический бета-3-рецептор
AKR1B1 – альдозоредуктаза
APOE – аполипопротеин E
ACE – ангиотензинпревращающий фермент
ETDRS – Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study
ITGA2 – интегрин альфа-2
MDR – multifactor dimensionality reduction
OD – острота зрения правого глаза
OS – острота зрения левого глаза
ROC-анализ – receiver operating characteristic
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста

Подписано в печать 27.04.2023. Формат 60×90 ¹/₁₆.

Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз. Заказ

Отпечатано в