

## АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ МУТАЦИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ, В ПОВОЛЖСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Исхакова А.Г.<sup>1</sup>, Тороповский А.Н.<sup>2</sup>, Золотарев А.В.<sup>1</sup>, Павлова О.Н.<sup>2</sup>, Комарова М.В.<sup>3</sup>, Викторов Д.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского», Самара;

<sup>2</sup>ООО «ТестГен», Ульяновск, e-mail: casiopeya13@mail.ru;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», Самара

В статье представлены современные подходы к диагностике пролиферативной и непролиферативной диабетической ретинопатии. На основе патогенеза выделены изменения в генах, которые могут лежать в основе наследственной предрасположенности к данному заболеванию. В настоящее время принято считать, что патогенез диабета является многофакторным, но генетические факторы риска играют в нем фундаментальную роль. Недавние исследования в области генома выявили несколько генетических локусов, участвующих в патогенезе диабета 1-го типа и 2-го типа. Установлено, что механизмы патогенеза диабетической ретинопатии разнообразны и достаточно сложны, однако немаловажную роль в них играют генетические факторы, которые, вероятно, определяют восприимчивость пациента к этой болезни, а также различия в частоте возникновения диабетической ретинопатии между индивидуумами с диабетом 1-го и 2-го типа. 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 диабетической ретинопатии в изученной группе больных сахарным диабетом 2-го типа. На наш взгляд, отрицательный результат данного исследования обусловлен гетерогенностью изученной группы по возрасту и стажу сахарного диабета, а также его различной компенсацией. Эти известные факторы риска диабетической ретинопатии могли помешать выявлению более слабых наследственных предрасположенностей.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, полиморфизм, генетические факторы риска, NOS3, AKR1B1, VEGF, ITGA2, ICAM1, ADRB3, APOE.

## ANALYSIS OF THE MUTATION FREQUENCY OF THE GENES ASSOCIATED WITH DIABETIC RETINOPATHY IN THE VOLGA REGION

Iskhakova A.G.<sup>1</sup>, Toropovsky A.N.<sup>2</sup>, Zolotarev A.V.<sup>1</sup>, Pavlova O.N.<sup>2</sup>, Komarova M.V.<sup>3</sup>, Viktorov D.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Budget Institution «Samara Regional Clinical Ophthalmological Hospital named after T.I. Yeroshevsky», Samara;

<sup>2</sup>TestGen LLC, Ulyanovsk, e-mail: casiopeya13@mail.ru;

<sup>3</sup>FGAOUE «Samara National Research University named after Academician S.P. Korolev», Samara

The article presents modern approaches to the diagnosis of proliferative and nonproliferative diabetic retinopathy. On the basis of pathogenesis, changes in genes that can be the basis of hereditary predisposition to the disease have been identified, and it is now considered that the pathogenesis of diabetes is multifactorial, but genetic risk factors play a fundamental role in it. Recent genome studies have revealed several genetic loci involved in pathogenesis, both type 1 and type 2 diabetes. The mechanisms of pathogenesis of diabetic retinopathy have been found to be diverse and complex, but genetic factors that probably determine the susceptibility of patients to the disease, as well as the differences in the frequency of diabetic retinopathy between individuals with type 1 and type 2 diabetes, play an important role in them. In the course of our study it was found that polymorphic loci of VEGF rs2010963, AKR1B1 rs759853, ITGA2 rs2910964, ADRB3 rs4994, APOE rs7412, APOE 429358 genes, considered independently of each other, are not related to the development of diabetic retinopathy in the studied group of patients with type II diabetes mellitus. In our opinion, the negative result of this study is due to the heterogeneity of the studied group in terms of age and experience of diabetes mellitus, as well as its different compensation. These known risk factors for diabetic retinopathy may have prevented the identification of weaker genetic predispositions.

Keywords: diabetic retinopathy, polymorphism, genetic risk factors, NOS3, AKR1B1, VEGF, ITGA2, ICAM1, ADRB3, APOE.

Одной из актуальнейших проблем современного человечества является неуклонно растущий уровень заболеваемости сахарным диабетом (СД). По сути, это совокупность заболеваний эндокринного характера, связанных с нарушением процесса усвоения глюкозы и обменных процессов в организме. Начальные стадии диабета могут протекать малосимптоматично, и заболевание обнаруживается на поздних стадиях развития, сопровождается системными осложнениями. Одним из таких сопутствующих осложнений является диабетическая ретинопатия (ДР) – заболевание, связанное с поражением сосудов сетчатки глаза и приводящее к инвалидности по зрению в 80–90% случаев; по данным Всемирной организации здравоохранения ДР является основной причиной слепоты у трудоспособного населения развитых стран и входит наряду с возрастной макулярной дегенерацией и глаукомой в число ведущих причин снижения зрения в возрастной группе старше 65 лет. Подсчитано, что слепота у больных СД развивается в 25 раз чаще, чем в среднем в популяции. Несмотря на то что данные о распространенности ДР варьируют в значительных пределах, бесспорным является тот факт, что, чем больше стаж СД, тем выше шансы развития ДР. В среднем патологические изменения сетчатки выявляются примерно у 80% пациентов, страдающих СД в течение 10 и более лет [1–3].

Длительность диабета и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии ретинопатии. Однако эти факторы сами по себе не объясняют возникновение сосудистых осложнений. Кроме того, у ряда пациентов с плохим гликемическим контролем даже за длительный период заболевания диабетом 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 на развитие ДР [4, 5]. 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.

В 2009 г. австралийскими исследователями Abhary S. с соавт. был проведен мета-анализ результатов нескольких исследований, касающихся взаимосвязи между генетическими факторами риска и развитием ДР [6]. Авторами исследования было проанализировано 702 публикации, из которых 160 публикаций – о геномном полиморфизме при ДР. Было выделено порядка 196 полиморфизмов 20 генов. Согласно разрозненным данным анализируемых публикаций выявлено, что полиморфизмы по генам NOS3, AKR1B1, VEGF, ITGA2 и ICAM1, ADRB3, APOE ассоциированы с ДР, при этом ген AKR1B1 имеет наибольшее число полиморфизмов, связанных с ДР. Большинство исследований приводят достаточное количество доказательств влияния генетического фактора на развитие ДР,

однако участие каждого из отмеченных генов-кандидатов на ДР неоднозначно. Исследователи склоняются к тому, что существует зависимость между генами-ассоциантами и этнической принадлежностью контрольной группы [7–9].

Выявление генетического риска развития ДР у больных СД 2-го типа еще до начала проявления клинической картины может способствовать повышению эффективности ранней диагностики, усовершенствованию стратегии профилактики и терапии данного осложнения.

С учетом всего вышесказанного целью исследования являлся анализ сопряженности полиморфных участков генов-кандидатов с наличием ДР у пациентов в Поволжской популяции больных СД и ДР.

### **Материал и методы исследования**

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

Всего в исследование были включены 475 пациентов: 79 мужчин и 396 женщин (17% и 83% соответственно), обратившихся в период с 2015 по 2018 гг. в ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского», удовлетворяющих критериям включения/исключения и давших письменное информационное согласие на участие в научном исследовании. 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% чуваша, 4,8% представители других народов Поволжья.

Критерии включения:

- больные с 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;
- наличие заключения по результатам офтальмологического осмотра;
- наличие результатов анализов на гликированный гемоглобин и глюкозу.

Критерии исключения:

- СД 1-го типа;
- хронические соматические заболевания в стадии декомпенсации;
- заболевания органа зрения, затрудняющие диагностику ДР.

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

Объектом исследования явились пробы венозной крови, полученные от пациентов, больных СД 2-го типа, прошедших офтальмологический осмотр. Образцы предоставлены ГБУЗ «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ерошевского».

Всем пациентам были проведены биохимические исследования крови (общий холестерин, триглицериды, глюкоза, гликированный гемоглобин), офтальмологическое обследование (измерение остроты зрения, внутриглазного давления, заключение о наличии/отсутствии катаракты, макулярного отека, оценка состояния стекловидного тела, офтальмоскопирование для выявления ДР), а также выявляли тип, стаж, вид терапии и степень компенсации СД на основании заключения эндокринолога.

Для выделения ДНК использовали набор реагентов «ДНК-Кровь-М» производства ООО «ТестГен», оптимально работающий при роботизированном выделении на станции Тесан.

В работе были использованы олигонуклеотидные праймеры и зонды для ПЦР в реальном времени, подобранные коллективом автором исходя из данных NCBI GeneBank. При проведении ПЦР реакционную смесь составили: dNTP, праймеры (VICE, FAME) и зонды с флуоресцентными метками по FAM/HEX (BHQ). На основании предварительно проведенных исследований было установлено, что оптимальным для постановки ПЦР является использование в реакционной смеси 2x Encyclo GC буфер и Encyclo polymerase. Для амплификации в работе использовали детектирующий амплификатор DTprime (ООО «ДНК-Технология», г. Москва). Процесс амплификации состоял из первичной денатурации, циклов амплификации и кривой плавления. Протокол амплификации был оптимизирован экспериментально. Детекция продуктов амплификации проводилась в реальном времени.

В разрабатываемую мультилокусную панель было отобрано 7 точечных мутаций, определение которых будет выявлять повышенный риск формирования ДР при СД: VEGF rs2010963, AKR1B1 rs759853, ITGA2 rs2910964, ADRB3 rs4994, ICAM1 rs13306430, APOE rs7412, APOE 429358. Оба локуса гена APOE при статистической обработке полученных данных анализировали совместно.

Статистический анализ данных выполняли в среде пакета IBM SPSS 21. Описательная статистика дана в виде абсолютных значений и частот (%) генотипов по изучаемым аллелям. Тестировались гипотезы доминирования одного или другого варианта мутантного локуса. Рассчитывали также частоты отдельных аллелей в изучаемых группах и проверяли их соответствие закону Харди–Вайнберга [10, 11]. Для сопоставления частот генотипов или

отдельных аллелей с наличием ретинопатии использовали критерий хи-квадрат Пирсона ( $\chi^2$ ). Для количественного представления силы слияния возможного генотипа на риск ДР рассчитывались отношения шансов и их 95%-ные доверительные интервалы. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05 [12].

### Результаты исследования и их обсуждение

Для анализа взаимосвязей генотипов пациентов с наличием или отсутствием ДР нами проведены исследования для проверки гипотезы доминирования того или иного аллеля и расчет уровня значимости каждого аллеля по критериям хи-квадрат и отношения шансов.

#### *Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена VEGF rs2010963*

В таблице 1 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата VEGF rs2010963 и наличием ДР.

Таблица 1

Взаимосвязь между полиморфными участками гена VEGF rs2010963 и наличием ДР

Генотип VEGF rs2010963	Нет ДР n=272		Есть ДР n=203		Отношение шансов (95%-ный доверительный интервал)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 C/C	89	32,72%	63	31,0%	1	0,15	0,926
Гетерозигота G/C	108	39,71%	83	40,9%	1,09 (0,71–1,67)		
Гомозигота 2 G/G	75	27,57%	57	28,1%	1,07 (0,67–1,72)		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	89	32,7%	63	31,0%	1	0,15	0,697
Гетерозигота + гомозигота 2	183	67,3%	140	69,0%	1,08 (0,73–1,6)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота	197	72,4%	146	71,9%	1	0,02	0,903
Гомозигота 2	75	27,6%	57	28,1%	1,03 (0,68–1,54)		

По данным, представленным в таблице, можно рассчитать теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычислить их доли и сопоставить с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

наблюдаемые аллели C:  $89+89+108+63+63+83=495$ ;

наблюдаемые аллели G:  $108+75+75+83+57+57=455$ .

Всего:  $C+G=495+455=950$ .

Доля C =  $495/950=0,521$ .

Доля  $G = 455/950=0,479$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a+b)^2=a^2+2ab+b^2$ , где в роли  $a$  и  $b$  подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$$CC = 0,521^2=0,271=27,2\%;$$

$$GC = 2*0,521*0,479=0,499= 49,9\%;$$

$$GG = 0,479^2=0,229=22,9\%.$$

Теоретически именно с рассчитанной частотой должны были бы встречаться изучаемые генотипы в популяции, однако с фактическими данными теоретические расчеты не совпали (табл. 2).

Таблица 2

Анализ распределения частоты генотипов гена VEGF rs2010963 в популяции

Общая группа	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс	%	Абс	%
Гомозигота 1	152	32,0%	129	27,2%
Гетерозигота	191	40,2%	237	49,9%
Гомозигота 2	132	27,8%	109	22,9%

$$\chi^2=17,9, p<0,001$$

При исследовании гена VEGF rs2010963 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке не соответствует равновесию Харди–Вайнберга ни у пациентов 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 человек (40,2%) и GG – 132 человека (27,8%). Это соответствует частотам аллелей C – 52,1% и G – 47,9% и, соответственно, 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.

*Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена ADRB3 rs4994*

В таблице 3 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата ADRB3 rs4994 и наличием ДР.

Таблица 3

Взаимосвязь между полиморфными участками гена ADRB3 rs4994 и наличием ДР

Генотип ADRB3 rs4994	Нет	Есть	Отношение	$\chi^2$	p
----------------------	-----	------	-----------	----------	---

	ретинопатии		ретинопатия		шансов (95%-ный доверительный интервал)		
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 Т/Т	218	80,15%	162	79,8%	1	1,564	0,458
Гетерозигота Т/С	52	19,12%	41	20,2%	1,06 (0,67–1,68)		
Гомозигота 2 С/С	2	0,74%	0	0,0%	–		
Итого	272	100%	203	100%			
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 Т/Т	218	80,1%	162	79,8%	1	0,009	0,926
Гетерозигота +гомозигота 2 (Т/С + С/С)	54	19,9%	41	20,2%	1,02 (0,65–1,61)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота (Т/Т+ Т/С)	270	99,3%	203	100,0%	1	1,499	0,221
Гомозигота 2 (С/С)	2	0,7%	0	0,0%	–		

По данным, представленным в таблице, также рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

наблюдаемые аллели Т:  $218+218 +52 +162+162+41=853$ ;

наблюдаемые аллели С:  $52+2+2 +41+0+0=97$ .

Всего:  $T + C = 853+97=950$ .

Доля Т =  $853/950=0,898$ .

Доля С =  $97/950=0,102$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a+b)^2=a^2+2ab=b^2$ , где в роли а и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$TT = 0,898^2=0,806=80,6\%$ ;

$ТС = 2*0,898*0,102=0,183= 18,3\%$ ;

$СС = 0,102^2=0,010=1,1\%$ .

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных (табл. 4).

Таблица 4

Анализ распределения частоты генотипов гена ADRB3 rs4994 в популяции

Общая группа	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Гомозигота 1	380	80,0%	383	80,6%
Гетерозигота	93	19,6%	87	18,3%
Гомозигота 2	2	0,4%	5	1,1%

При исследовании гена ADRB3 rs4994 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди–Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: ТТ – 380 человек (80,0%), ТС – 93 человека (19,6%) и СС – 2 человека (0,4%). Это соответствует частотам аллелей Т – 89,8% и С – 10,2% и, соответственно, теоретическому распределению генотипов ТТ/ТС/СС – 80,6% / 18,3% / 1,1%, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

Необходимо отметить, что редкий аллель гена ADRB3 в позиции rs4994 у изученной группы больных встречался лишь у 10% пациентов, что соответствует теоретической частоте гомозигот в популяции порядка 1%. Это статистически неотличимо от наблюдаемых больных из обеих групп с носителями генотипа СС. Если данный генотип и имел неблагоприятное прогностическое влияние на риск развития ретинопатии, то при данном объеме исследования его невозможно было доказать.

#### *Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена ITGA2 rs2910964*

В таблице 5 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата ITGA2 rs2910964 и наличием ДР.

Таблица 5

#### Взаимосвязь между полиморфными участками гена ITGA2 rs2910964 и наличием ДР

Генотип ITGA2 rs2910964	Нет ретинопатии		Есть ретинопатия		Отношение шансов (95%-ный доверительный интервал)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
					Референс – 1-й аллель		
Гомозигота 1 С/С	94	34,56%	72	35,5%	1	0,142	0,932
Гетерозигота С/Т	134	49,26%	97	47,8%	0,95 (0,63–1,41)		
Гомозигота 2 Т/Т	44	16,18%	34	16,7%	1,03 (0,6–1,78)		
Итого	272	100%	203	100%			
<i>Гипотеза рецессивности дикого (I-go) аллеля</i>							
Гомозигота 1 С/С	94	34,7%	72	35,5%	1	0,031	0,860
Гетерозигота + гомозигота 2 (С/Т+ Т/Т)	177	65,3%	131	64,5%	0,97 (0,66–1,41)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (I-go) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота (С/С + С/Т)	228	84,1%	169	83,3%	1	0,066	0,797
Гомозигота 2 Т/Т	43	15,9%	34	16,7%	1,07 (0,65–1,74)		



По данным, представленным в таблице, также рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

наблюдаемые аллели С:  $94+94 +134 +72+72+97=563$ ;

наблюдаемые аллели Т:  $134+44+44 +97+34+34=387$ .

Всего:  $C+T = 563+387=950$ .

Доля С =  $563/950=0,592$ .

Доля Т =  $387/950=0,408$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a+b)^2=a^2+2ab=b^2$ , где в роли а и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$CC= 0,592^2=0,350=35,0\%$ ;

$CT = 2*0,592*0,408=0,483= 48,3\%$ ;

$TT = 0,408^2=0,167=16,7\%$ .

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных (табл. 6).

Таблица 6

Анализ распределения частоты генотипов гена ITGA2 rs2910964 в популяции

Общая группа	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Гомозигота 1	166	34,9%	166	35,0%
Гетерозигота	231	48,6%	229	48,3%
Гомозигота 2	78	16,4%	80	16,7%

При исследовании гена ITGA2 rs2910964 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди–Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: СС – 166 человек (34,9%), СТ – 231 человек (48,6%) и ТТ – 78 человек (16,4%). Это соответствует частотам аллелей С – 59,2% и Т – 40,8% и, соответственно, теоретическому распределению генотипов СС/СТ/ТТ – 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  $p \gg 0,005$ .

*Характеристика распределения генотипов полиморфного участка гена AKR1B1 rs759853*

В таблице 7 приведен анализ сопряженности между полиморфными участками гена-кандидата AKR1B1 rs759853 и наличием ДР.

Таблица 7

Взаимосвязь между полиморфными участками гена AKR1B1 rs759853 и наличием ДР

Генотип AKR1B1 rs759853	Нет ДР, n=272		Есть ДР n=203		Отношение шансов (95%-ный доверительный интервал)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 G/G	104	38,24%	73	36,0%	1	1,482	0,477
Гетерозигота G/A	132	48,53%	95	46,8%	1,03 (0,69–1,53)		
Гомозигота 2 A/A	36	13,24%	35	17,2%	1,39 (0,8–2,41)		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	104	38,2%	73	36,0%	1	0,257	0,612
Гетерозигота + гомозигота 2	168	61,8%	130	64,0%	1,1 (0,76–1,61)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + Гетерозигота	236	86,8%	168	82,8%	1	1,467	0,226
Гомозигота 2	36	13,2%	35	17,2%	1,37 (0,82–2,26)		

По данным, представленным в таблице, также рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка данного гена, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

наблюдаемые аллели G:  $104+104 +132 +73+73+95=581$ ;

наблюдаемые аллели A:  $132+36+36 +95+35+35=369$ .

Всего:  $G+A = 581+369=950$ .

Доля G =  $581/950=0,612$ .

Доля A =  $369/950=0,388$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a+b)^2=a^2+2ab=b^2$ , где в роли a и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$$GG = 0,612^2 = 0,375 = 37,5\%;$$

$$GA = 2 * 0,612 * 0,388 = 0,475 = 47,5\%;$$

$$AA = 0,388^2 = 0,150 = 15,0\%.$$

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных (табл. 8).

Таблица 8

Анализ распределения частоты генотипов гена AKR1B1 rs759853 в популяции

Общая группа	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Гомозигота 1	177	37,3%	178	37,5%
Гетерозигота	227	47,8%	226	47,5%
Гомозигота 2	71	14,9%	71	15,0%

При исследовании гена AKR1B1 rs759853 установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди–Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

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

*Характеристика распределения генотипов полиморфных участков гена APOE rs7412 и rs429358*

Исследование гена APOE мы проводили в двух участках – rs7412 и rs429358. В таблице 9 приведен анализ сопряженности между полиморфным участком rs7412 гена-кандидата APOE и наличием ДР.

Таблица 9

Взаимосвязь между полиморфными участками гена APOE rs7412 и наличием ДР

Генотип APOE rs741	Нет ДР, n=272		Есть ДР n=203		Отношение шансов (95%-ный доверительный интервал)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 С/С	229	84,19%	169	83,3%	1	0,134	0,935
Гетерозигота С/Т	41	15,07%	32	15,8%	1,06 (0,64–1,75)		
Гомозигота 2 Т/Т	2	0,74%	2	1,0%	1,36 (0,19–9,72)		
<i>Гипотеза</i>							

<i>рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	229	84,2%	169	83,3%	1	0,076	0,783
Гетерозигота + гомозигота 2	43	15,8%	34	16,7%	1,07 (0,66–1,75)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + гетерозигота	270	99,3%	201	99,0%	1	0,087	0,768
Гомозигота 2	2	0,7%	2	1,0%	1,34 (0,19–9,62)		

Также по табличным данным рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка rs7412 гена APOE, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

наблюдаемые аллели С:  $229+229+41+169+169+32=869$ ;

наблюдаемые аллели Т:  $41+2+2+32+2+2=81$ .

Всего:  $C+T=869+81=950$ .

Доля С =  $869/950=0,915$ .

Доля Т =  $81/950=0,085$ .

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a+b)^2=a^2+2ab=b^2$ , где в роли а и b подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$CC=0,915^2=0,837=83,7\%$ ;

$CT=2*0,915*0,085=0,156=15,6\%$ ;

$TT=0,085^2=0,007=0,7\%$ .

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных (табл. 10).

Таблица 10

Анализ распределения частоты генотипов гена APOE rs7412 в популяции

Общая группа	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Гомозигота 1	398	83,8%	398	83,7%
Гетерозигота	73	15,4%	74	15,6%
Гомозигота 2	4	0,8%	3	0,7%

При исследовании участка rs7412 гена APOE установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди–Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: СС – 398 человек (83,8%), СТ – 73 человек (15,4%) и ТТ – 4 человека (0,8%). Это соответствует частотам аллелей С – 91,5% и Т – 8,5% и, соответственно, теоретическому распределению генотипов СС/СТ/ТТ – 83,7% / 15,6% / 0,7%, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

По аналогичной схеме проведен анализ участка rs429358 гена APOE (табл. 11).

Таблица 11

Взаимосвязь между полиморфными участками гена APOE rs429358 и наличием ДР

Генотип APOE rs429358	Нет ДР, n=272		Есть ДР n=203		Отношение шансов (95%-ный доверительный интервал)	$\chi^2$	p
	Абс.	%	Абс.	%			
Гомозигота 1 Т/Т	204	75,00%	160	78,8%	1	0,95	0,622
Гетерозигота Т/С	65	23,90%	41	20,2%	0,8 (0,52–1,25)		
Гомозигота 2 С/С	3	1,10%	2	1,0%	0,85 (0,14–5,15)		
<i>Гипотеза рецессивности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1	204	75,0%	160	78,8%	1	0,946	0,331
Гетерозигота +гомозигота 2	68	25,0%	43	21,2%	0,81 (0,52–1,24)		
<i>Гипотеза доминантности дикого (1-го) аллеля</i>							
Гомозигота 1 + Гетерозигота	269	98,9%	201	99,0%	1	0,015	0,901
Гомозигота 2	3	1,1%	2	1,0%	0,89 (0,15–5,39)		

Также по табличным данным рассчитывали теоретические доли доминантных и рецессивных аллелей участка rs429358 гена APOE, вычисляли их доли и сопоставляли с распределением аллелей среди фактических пациентов.

Таким образом:

наблюдаемые аллели Т: 204+204 +65 +160+160+41=834;

наблюдаемые аллели С: 65+3+3 +41+2+2=116.

Всего: Т+С = 834+116=950.

Доля С = 834/950=0,878.

Доля Т = 116/950=0,122.

Теоретические частоты генотипов определяются из соотношения:

$(a+b)^2=a^2+2ab=b^2$ , где в роли  $a$  и  $b$  подставим обозначения нуклеотидных полиморфизмов.

Следовательно, теоретические доли генотипов следующие:

$$ТТ = 0,878^2 = 0,771 = 77,1\%;$$

$$ТС = 2 * 0,878 * 0,122 = 0,214 = 21,4\%;$$

$$СС = 0,122^2 = 0,015 = 1,5\%.$$

Так как теоретически рассчитанная частота изучаемых генотипов в популяции должна совпадать с реальной, мы провели сопоставление теоретических и практических данных (табл. 12).

Таблица 12

Анализ распределения частоты генотипов гена АРОЕ rs429358 в популяции

Общая группа	Наблюдаемые		Теоретические	
	Абс.	%	Абс.	%
Гомозигота 1	364	76,6%	366	77,1%
Гетерозигота	106	22,3%	102	21,4%
Гомозигота 2	5	1,1%	7	1,5%

При исследовании участка rs429358 гена АРОЕ установлено, что распределение генотипов в изучаемом участке соответствует равновесию Харди–Вайнберга у пациентов обеих групп и в популяции в целом.

Так, наблюдаемые частоты генотипов в общей группе были: ТТ – 364 человека (76,6%), ТС – 106 человек (22,3%) и СС – 5 человек (11%). Это соответствует частотам аллелей Т – 87,8% и С – 12,2% и, соответственно, теоретическому распределению генотипов ТТ/ТС/СС – 77,1% / 21,4% / 1,5%, что статистически незначимо отличается от наблюдаемых частот.

В настоящее время принято считать, что патогенез диабета является многофакторным, но генетические факторы риска играют в нем фундаментальную роль. Недавние исследования в области генома выявили несколько генетических локусов, участвующих в патогенезе диабета как 1-го, так и 2-го типа. Установлено, что механизмы патогенеза ДР разнообразны и достаточно сложны, однако немаловажную роль в них играют генетические факторы, которые, вероятно, определяют восприимчивость пациента к этой болезни, а также различия в частоте ДР между индивидуумами с диабетом 1-го типа и 2-го типа.

Длительность заболевания диабетом и недостаточный гликемический контроль являются двумя наиболее важными факторами в развитии ретинопатии [6]. Однако эти факторы сами по себе не объясняют возникновение сосудистых осложнений. Кроме того, у ряда пациентов с плохим гликемическим контролем даже за большой промежуток времени

ретинопатия не развивается, в то время как у некоторых пациентов с хорошим гликемическим контролем ретинопатия развивается уже в течение нескольких лет. В этой связи предполагается важная роль генетических факторов в развитии ДР [5].

**Выводы.** 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 больных сахарным диабетом 2-го типа. На наш взгляд, отрицательный результат данного исследования обусловлен гетерогенностью изученной группы по возрасту и стажу сахарного диабета, а также его различной компенсацией. Эти известные факторы риска ДР могли помешать выявлению более слабых наследственных предрасположенностей.

### Список литературы

1. Воробьева И.В., Меркушенкова Д.А. Диабетическая ретинопатия у больных сахарным диабетом второго типа. Эпидемиология, современный взгляд на патогенез. Обзор. // Офтальмология. 2012. Т. 9, № 4. С. 18–21.
2. Шадричев Ф.Е., Астахов Ю.С., Григорьева Н.Н., Шклярков Е.Б., Александрова О.Н., Крянева О.Я., Рутенбург Е.Л., Карпова И.А. Эпидемиологические аспекты поражения сетчатки у больных сахарным диабетом (результаты скрининга диабетической ретинопатии в Санкт-Петербурге) // Офтальмологические ведомости. 2009. №4 (2). С. 13–18.
3. Noda K., Ishida S. Role of chronic inflammation in diabetic retinopathy. Inflammation and Regeneration. 2013. Vol. 33. N 5. P. 230-237.
4. Шулькин А.В., Колесников А.В., Баренина О.И., Никифоров А.А. Генетические маркеры развития диабетической ретинопатии // Фундаментальные исследования. 2014. №4-2. С. 411-414.
5. Балашевич Л.И., Измайлов А.С. Диабетическая офтальмопатия. СПб.: Человек, 2012. 336 с.
6. Abhary S., Hewitt A.W., Burdon K.P., Craig J.E. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. Diabetes. 2009. № 58(9). P. 2137- 2147.
7. Могилевский С.Ю., Бушуева О.В., Зяблицев С.В. Связь полиморфизмов RS759853 и RS9640883 гена AKR1B1 с клинико-лабораторными показателями при диабетической ретинопатии // Офтальмология. Восточная Европа. 2017. Т. 7, № 1. С. 8-17.
8. Муженя Д.В., Тугуз А.Р., Дорошенко А.С., Руденко К.А., Анохина Е. Н. Роль LEU28/28PRO полиморфизмов гена APOE в регуляции липидного обмена у высококвалифицированных спортсменов республики Адыгея // Вестник Адыгейского государственного университета. 2013. №1(116). С. 73-80.

9. Муслимова Э.Ф., Реброва Т.Ю., Афанасьев С.А., Сергиенко Т.Н., Репин А.Н. Ассоциация генов ITGB3 и NOS3 с тяжестью течения ишемической болезни сердца при наличии и отсутствии сахарного диабета 2-го типа // Сахарный диабет. 2016. Т. 19. №4. С. 303-308.
10. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
11. Namipashaki A., Razaghi-Moghadam Z., Ansari-Pour N. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. Cell J. 2015. V. 17(2). P. 187–192. DOI: 10.22074/cellj.2016.3711.
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.