

## МОДЕЛЬ ПРОГНОЗУ ТЯЖКОСТІ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ НА ПІДСТАВІ ВИЗНАЧЕННЯ ОЧНИХ БІОМАРКЕРІВ

*Литвиненко Т.В.* <https://orcid.org/0009-0004-9200-8583>

*Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна*

*lytvynenko1968@ukr.net*

**Актуальність.** Локальне профілювання внутрішньоочної рідини (ВОР) відбиває ключові ланки патобіології діабетичної ретинопатії (ДР) – гіпоксію, запалення та нейронально гліальний дистрес. Комбінування маркерів цих осей у мультифакторній моделі може підвищити точність стратифікації ризику та обґрунтувати подальший індивідуальний менеджмент пацієнта.

**Ціль:** встановити вміст гіпоксіяіндуцибельного фактору-1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ), інтерлейкінів (IL 1 $\beta$ , IL 4, IL 6, IL 8) та нейроноспецифічної енолази (NSE) у ВОР та визначити його зв'язок із тяжкістю ДР, а також оцінити аналітичну придатність побудови багатофакторної моделі прогнозу для стратифікації пацієнтів із цукровим діабетом (ЦД) 2 типу.

**Матеріали та методи.** Обстежено 110 пацієнтів із ЦД 2 типу, розподілених за шкалою ICDR (2003) на п'ять груп: ДР0 (n=15), НПДР1 (n=40), НПДР2 (n=25), НПДР3 (n=12), ПДР (n=18); контроль – 25 осіб без ЦД/ДР, зіставні за віком і статтю. ВОР (0,1 мл) отримували під час факоемультсифікації катаракти; рівні HIF 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 4, IL 6, IL 8 (пг/мл) та NSE (мг/мл) визначали імуноферментним методом. Статистична обробка отриманих даних: EZR v.1.54; непараметричні тести; багатофакторна регресійна модель із покроковим відбором; багатокласова класифікація One vs All (індекс Юдена) та клінічно релевантна бінаризація фенотипів ДР.

**Результати.** Покроковий відбір виокремив три незалежні предиктори тяжкості ДР – NSE, IL 8 (прямий зв'язок) та IL 4 (зворотний зв'язок). Модель була адекватною: R<sub>2</sub>adjust=0,84, F=219,5, p<0,001; VIF<3 для всіх коефіцієнтів. У багатокласовій OVA класифікації встановлено пороги Y (ум. од.) для стадій: контроль 2,27; ДР0 2,48; НПДР1 3,14; НПДР2 4,52; НПДР3/ПДР 6,07; загальна точність 74% (95% ВІ: 66%-82%). Бінаризація (НПДР1+НПДР2 vs НПДР3+ПДР) з порогом Y=2,71 підвищувала інтегральну точність до 80% (95% ВІ: 72%-86%); для групи НПДР3+ПДР чутливість становила 87,5%, специфічність – 100%. Маркери HIF 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6 демонстрували стадієзалежні тренди, однак не покращували узагальнену предиктивну здатність після включення NSE/IL 8/IL 4.

**Висновки.** Трифакторна модель на основі NSE, IL 8, IL 4 у ВОР здатна прогнозувати тяжкість ДР і забезпечує як багатокласові, так і бінарні пороги для практичного застосування. Поріг Y $\geq$ 2,71 може використовуватися як критерій стратифікації ризику для інтенсифікації нагляду та цільового ОКТА моніторингу пацієнтів із високою ймовірністю тяжких форм ДР.

**Ключові слова:** діабетична ретинопатія; цукровий діабет 2 типу; внутрішньоочна рідина; гіпоксіяіндуцибельний фактор-1 $\alpha$ ; інтерлейкін 4; інтерлейкін 8; нейроноспецифічна енолаза; біомаркери; стратифікація ризику.

**Актуальність.** Діабетична ретинопатія (ДР) належить до провідних причин сліпоти та помірного/тяжкого порушення зору у світі; за оцінками консорціуму GBD/VLEG (2019 р./2020 р.) частка втрати зору, зумовлена ДР, істотно зросла за останні 30 років [1]. На тлі глобальної епідемії цукрового діабету (ЦД) – 588,7 млн осіб у 2024 р. із прогнозом до 852,5 млн у 2050 р. – потреба в ризик адаптованому нагляді лише зростає [2].

У офтальмологічній практиці широко застосовується Міжнародна клінічна шкала тяжкості ДР (ICDR), яка включає стадію без ретинопатії, легку/помірну/тяжку непроліферативну ДР (НПДР) та проліферативну ДР (ПДР), однак її структурні критерії не завжди чутливі до ранніх ішемічно нейроваскулярних змін [3]. Сучасна оптична когерентна томографія з функцією ангиографії (ОКТА) слугує «містком» між морфологією і патобіологією ДР: саме неперфузія в глибокому капілярному сплетенні сітківки асоціюється з ризиком ускладнень у підтвердженій НПДР (вже на стадії помірної НПДР) [4] і локалізується переважно перивенулярно в очах із ЦД без клінічної ДР [5].

Центральним регулятором відповіді сітківки на гіпоксію є гіпоксіяіндуцибельний фактор-1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ) – кисневочутливий транскрипційний фактор, який стабілізується в умовах гіпоксії/гіперглікемії та координує експресію проангіогенних і бар'єррегулюючих генів (зокрема васкулоендотеліального фактору росту (VEGF)), одночасно зрушуючи метаболізм у бік гліколізу, що на фенотиповому рівні проявляється підвищенням судинної проникності, прогресуючою капілярною неперфузією та неоангіогенезом [6, 7]. Ендотеліальна дисфункція та запальна активація підсилюють HIF сигналінг, формуючи порочне коло гіпоксично запального стресу нейроваскулярної одиниці [8].

Для ока саме внутрішньоочна рідина (ВОР) найбільш точно відбиває локальні біохімічні події: у пацієнтів із ДР/ДМН у ВОР виявляють підвищення гліколітичних метаболітів [9], а порівняльні дослідження ВОР vs сироватки підтверджують різну інформативність

середовищ для виявлення біомаркерів патології тканин ока [10, 11]. У нашій попередній роботі з локальним вимірюванням HIF 1 $\alpha$  у ВОР показано його «сходінковий» градієнт за стадіями ICDR і визначено робочі пороги як для багатокласової, так і для клінічно релевантної бінарної стратифікації (легка/помірна vs важка ДР), що додатково обґрунтовує фокус на HIF осі як на молекулярному «якорі» майбутньої моделі [12].

ДР – хронічне запальне мікросудинне захворювання, при якому у внутрішньоочних середовищах найпоєднованіші сигнали дають інтерлейкіни (IL): IL 6 і IL 8, що підтверджено панелями ВОР/склистої тіла та метааналізами [13, 14]. Вміст IL 6 був збільшеним у зонах підвищеної проникності судин/набряку, а IL 8 асоціювався з ризиком ДМН та ускладнень.

Важливою ланкою є і IL 1 $\beta$  – ключовий ефектор NLRP3 (сімейство рецепторів, подібних до Nod, що містять домен пірину 3)/інфламасоми, який через ядерний фактор-каппа (NF  $\kappa$ B) і залежні від нього шляхи, оксидативний стрес і піроптоз посилює мікросудинну дисфункцію та бар'єрну проникність [15, 16].

На цьому тлі IL 4 виконує контррегуляторну роль шляхом впливу на Т-хелперну 2 (Th2)-відповідь: змінює фенотип мікроглії на відновний, підтримує виживання перицитів і зменшує ендотеліальну проникність – тобто потенційно гальмує ланцюг нейрозапалення, бар'єрної дисфункції і набряку/ішемії [17]. У сукупності це формує аргументи на користь включення IL осьових маркерів до моделі стратифікації.

Нейроноспецифічна енолаза (NSE) –  $\gamma$  ізоформа енолази, класичний індикатор нейронального/нейроендокринного дистресу [18, 19]. Для ока підвищення NSE у локальних середовищах показано при регматогенному відшаруванні сітківки [20] і ретинобластомі [21, 22]. Сучасні протеомні дослідження підтверджують, що ВОР при ПДР насичена нейро та ангиоактивними молекулами, розкриваючи біологічний контекст зростання NSE з тяжкими фенотипами ДР [23, 24]. Цей нейронально гліальний «слід» доповнює

гіпоксичну й запальну осі, забезпечуючи більш повний опис континууму ДР.

Враховуючи обмеження окремих біомаркерів у багатокласовій дискримінації стадій ДР, що характерно для безперервного патогенезу захворювання [12], актуальним є розробка мультипараметричних моделей, які можуть інтегрувати гіпоксичні (HIF 1 $\alpha$ ), запальні (IL вісь) і нейронально гліальні (NSE) механізми, та можуть слугувати основою для скринінгу та ризик адаптованого менеджменту пацієнтів.

**Ціль:** встановити вміст гіпоксіяіндуцибельного фактору-1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ), інтерлейкінів (IL 1 $\beta$ , IL 4, IL 6, IL 8) та нейронспецифічної енолази (NSE) у внутрішньоочній рідині та визначити його зв'язок із тяжкістю діабетичної ретинопатії, а також оцінити аналітичну придатність побудови багатофакторної моделі прогнозу для стратифікації пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі дослідження виконано з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та відповідали чинному законодавству України. На проведення дослідження було отримане дозвіл комісії з біоетики та академічної доброчесності Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 196 від 23.06.2025 р.). За дизайном дослідження було одноцентровим поперечним (cross-sectional) аналізом з проспективним збором матеріалу. Всі пацієнти, залучені у дослідження, надали інформовану згоду на участь.

До дослідження було залучено 110 пацієнтів з ЦД 2 типу та ДР, в яких враховували показники найгіршого за станом ДР ока (110 очей). Пацієнтів згідно до класифікації за Міжнародною шкалою тяжкості ДР [3] було розподілено на 5 груп: 1-а без ретинопатії (ДР0; n=15); 2-а – з початковою

НПДР (НПДР1; n=40); 3-я – з помірною НПДР (НПДР2; n=25); 4-а – з тяжкою НПДР (НПДР3; n=12) і 5-а – з ПДР (n=18).

Пацієнти були у віці від 50 до 76 років (62,5; 51,3-69); чоловіків було 92 (83,6%), жінок – 18 (16,4%), що за стадіями ДР не відрізнялося (p=0,970). До контрольної групи залучено 25 осіб відповідного віку та статі, які не мали ЦД та ДР і проходили оперативне лікування з приводу вікової катаракти.

Усім пацієнтам були виконані візометрія на проекторі тестових знаків преміум “C.S.O. srl.” (США) з використанням набору пробних об'єктів “Optiek XL” (США) та фороптері “Takagi VT-5” (Takagi Seiko Co Ltd, Японія); рефрактометрія на авторефератометрії “TOPCON KR 7000P” (TOPCON Corporation, Японія); тонометрія на автоматичному безконтактному тонометрі “Huvitz HNT-7000” і кератопахіметрія на приладі “HNT-1P” (Huvitz, Корея); біомікроскопія на щілинній лампі “CSO Slitlamp SL-9900” з відео системою “Led 5x” (Італія) та біокулярному офтальмоскопі “Heine Omega 600 Traveler Set” (“HEINE”, Німеччина); гоніоскопія з використанням контактної тридзеркальної лінзи “Optiek XL” (США); офтальмоскопія за допомогою лінз “Volk Digital wide field” (Німеччина) та контактної тридзеркальної лінзи Гольдмана; оптична когерентна томографія на приладі оптико-когерентний томограф з фундус-камерою та ангиографією “НОСТ-1F” (Huvitz Co Ltd, Корея).

У внутрішньоочній рідині, що була отримана під час операції факоемulsифікації катаракти, через парацентез передньої камери у кількості 0,1 мл, методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням тест-систем Invitrogen Thermo Fisher Sci. (США) визначали вміст HIF-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8 (пг/мл) і NSE (мг/мл).

Для статистичного аналізу отриманих результатів використано пакет EZR v.1.54 (графічний інтерфейс до R statistical software v.4.0.3, R Foundation for Statistical Computing, Австрія). Оскільки закон розподілу даних відрізнявся від нормального розраховували медіани (Me) та міжквартильні інтервали (Q1-

Q3). Групові порівняння проведені за критерієм Крускала-Уолліса, попарні – за критерієм Данна, рівень статистичної значущості прийнятий рівним 0,05. Для виявлення зв'язку факторних ознак із тяжкістю ДР було використано метод побудови та аналізу багатофакторних моделей лінійної регресії [25]. В якості результуючої ознаки (Y) прогнозувалася стадія ДР, в якості факторів ризику аналіз проводився для 6 ознак: HIF-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8 і NSE. Для відбору значимих ознак використано метод покрокового відкидання/додавання (при критичних порогах  $p < 0,1$  для включення ознаки у модель та  $p > 0,2$  для виключення із моделі). Для вибору оптимальних порогів використано метод багатокласової класифікації One-vs-All (OVA) [26].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

До аналізу було включено 110 пацієнтів із ЦД 2 типу, розподілених за шкалою ICDR на п'ять клінічних груп: від ДР0 до ПДР. Розподіл за статтю (жінок – 18 (16,4%), чоловіків – 92 (83,6%;  $p = 0,9703$ )) і віком ( $p = 0,108$ ) був однорідним у межах усіх груп. Тривалість ЦД зростала разом із тяжкістю ДР: медіани (QI-QIII), роки – 5 (3,3-7,5) у ДР0; 10 (5-14,5) у НПДР1; 14 (10-18,5) у НПДР2; 16,5 (10-21) у НПДР3; 15,5 (15-25) у ПДР ( $p < 0,001$ ). Показники глікемії та HbA1c мали тенденцію до вищих значень у тяжчих стадіях ДР без статистично значущих міжгрупових відмінностей (глюкоза  $p = 0,176$ ; HbA1c  $p = 0,101$ ), у той же час вміст С пептиду поступово знижувався зі зростанням тяжкості ДР ( $p = 0,108$ ).

Візуалізація на рис. 1 продемонструвала закономірні градієнти гіпоксичних/нейронально гліальних маркерів: HIF 1 $\alpha$  послідовно зростав від ДР0 до ПДР з найбільш виразним приростом на переході зі стадії НПДР2 до НПДР3, що відображало активацію гіпоксичної відповіді у тяжчих фенотипах ДР. NSE мав більш чіткий ступінчастий профіль: низькі рівні в контролі/ДР0, помірне зростання в НПДР1-НПДР2 та різкий підйом у НПДР3-ПДР, консистентний із накопиченням нейронально гліального стресу.

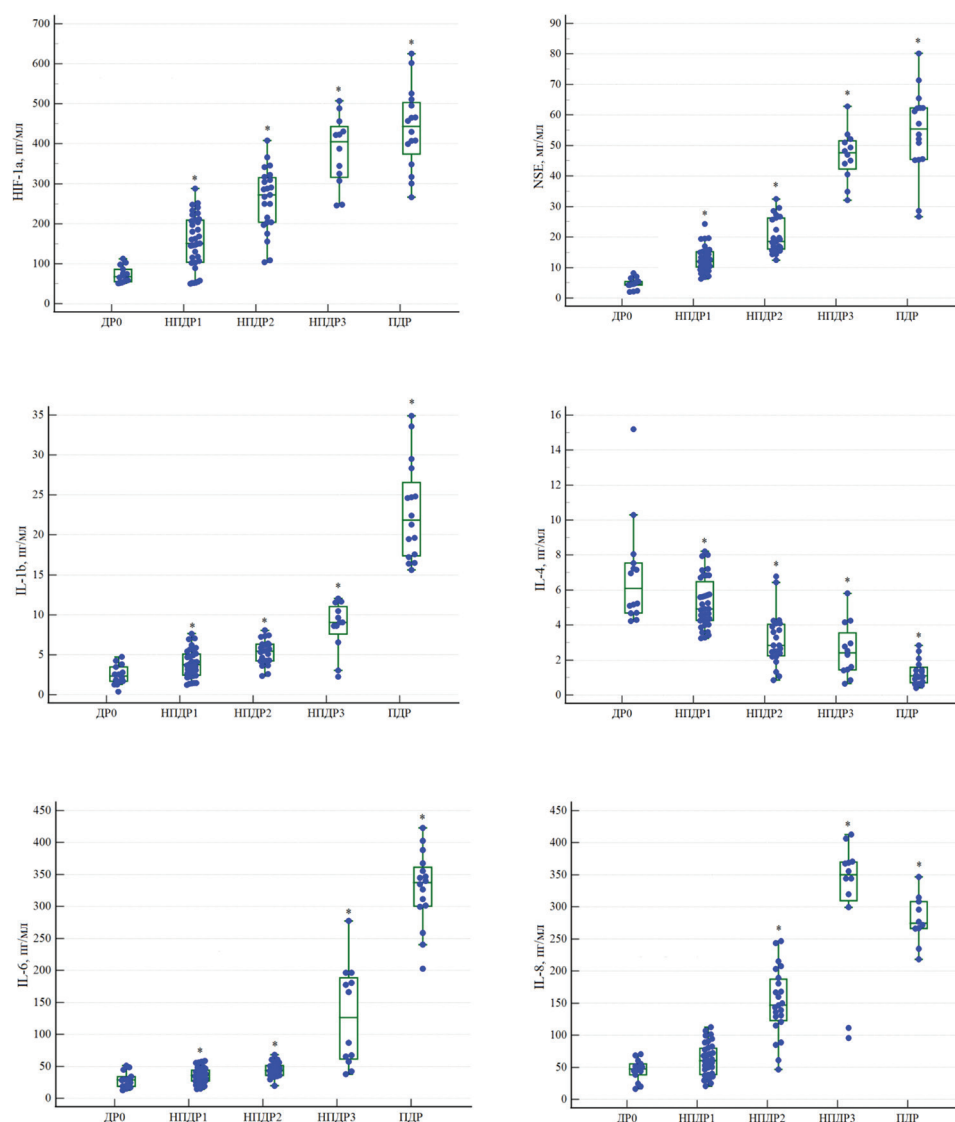
Серед запальних маркерів спостерігались також закономірні, але різні за формою градієнти: IL 1 $\beta$  монотонно зростав від контролю до ПДР; IL 4, навпаки, знижувався зі збільшенням тяжкості ДР; IL 6 мав найбільший динамічний діапазон із різким підйомом на етапі НПДР3 і збереженням високих рівнів у ПДР; IL 8 характеризувався «піковим» профілем з максимумом у НПДР3 та відносним зменшенням у ПДР.

Для виявлення зв'язку вмісту досліджених речовин зі стадією ДР було проведено багатофакторний аналіз в рамках моделей лінійної регресії. В якості результуючої ознаки (Y) прогнозувалася стадія ДР, у якості факторних ознак було проаналізовано 6 показників: вміст у BOP HIF-1 $\alpha$  і NSE, а також інтерлейкінів IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6 та IL-8. Методом Stepwise було виділено 3 значущі ознаки: NSE, IL-4, IL-8 (табл. 1).

Модель, що була побудована адекватна, скорегований коефіцієнт детермінації моделі  $R^2_{\text{adjust}} = 0,84$  (значення критерію Фішера  $F = 219,5$ , відмінне від 1 при  $p < 0,001$ ), що підтверджувало дуже сильний зв'язок показників з тяжкістю ДР. У отриманій моделі вміст у BOP NSE та IL-8 мав позитивний характер зв'язку з тяжкістю ДР, тоді як вміст IL-4 – від'ємний.

За показником коефіцієнту частинної кореляції ( $r_{\text{semipartial}}$ ) максимальний незалежний зв'язок з тяжкістю ДР мав вміст NSE (див. табл. 1). Низьке значення дисперсійно-інфляційного фактору ( $VIF < 3$  для всіх коефіцієнтів) підтверджувало відсутність мультиколінеарності, тобто – взаємозалежності прогностичних факторів та вказувало на незалежний вклад кожного показника у прогнозування тяжкості ДР.

Для вибору оптимальних порогів багатокласової класифікації за отриманою трифакторною моделлю використано One-vs-All (OVA) підхід. Оптимальний поріг Y для кожного класу обирали за Youden Index, для контрольної групи він становив 2,27; для класу ДР0 – 2,48; для класу НПДР1 – 3,14; для класу НПДР2 – 4,52; для класів НПДР3 і ПДР – 6,07 (рис. 2).



**Рис. 1.** Вміст у внутрішньоочній рідині HIF-1α (пг/мл), NSE (мг/мл), IL-1β (пг/мл), IL-4 (пг/мл), IL-6 (пг/мл) і IL-8 (пг/мл) у групах дослідження; за вертикальною віссю – вміст речовин; сині кружечки – дані вмісту речовин у пацієнтів; горизонтальні рисочки у зелених прямокутниках – медіани (Me); у прямокутниках – значення I і III кватилів (QI–QIII); \* – відмінність від контрольної групи статистично значуща (p<0,05)

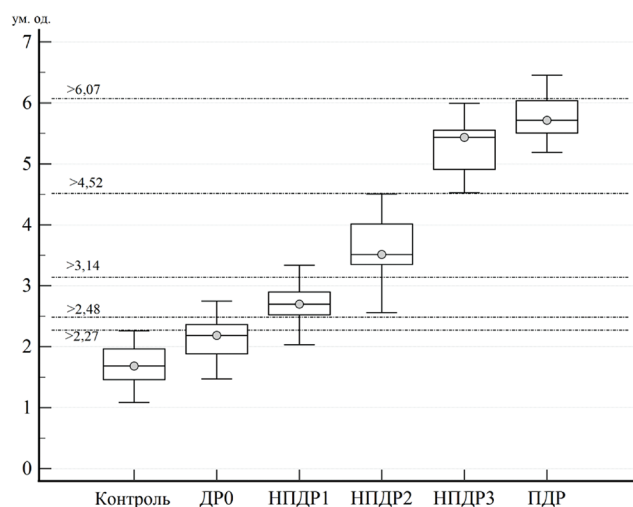
Таблиця 1

**Багатофакторна модель логістичної регресії прогнозування тяжкості ДР на підставі вмісту у внутрішньоочній рідині NSE, IL-4 і IL-8**

Показник	Значення коефіцієнту моделі, $b \pm m$	Рівень значимості відмінності від 0	Коефіцієнт частинної кореляції (rsemipartial)	Дисперсійно-інфляційний фактор (VIF)
Константа	2,55±0,19	<0,0001		
NSE	0,039±0,005	<0,0001	0,303	2,53
IL-4	-0,130±0,024	<0,0001	0,196	1,87
IL-8	0,004±0,001	<0,0001	0,186	2,26

Загальна точність прогнозу склала 74% (СІ 66%-82%). Висока ступінь перекриття між суміжними класами, особливо для стадій НПДР, обмежувало роздільну здатність отриманої моделі (табл. 2).

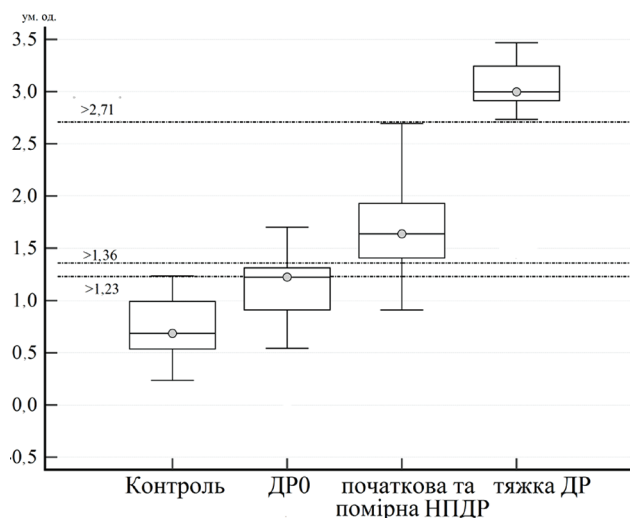
Враховуючи часову безперервність прогресій тяжкості ДР з одного боку та дискретний характер клінічної шкали ICDR з іншого, була застосована спроба покращення аналітичних характеристик моделі шляхом релевантної бінаризації ДР-фенотипів з формуванням двох інтегрованих груп: початкова/помірна ДР (НПДР1+НПДР2) та тяжка ДР (НПДР3+ПДР) (табл. 3).



**Рис. 2.** Межові значення прогнозу тяжкості ДР (Y, ум. од.) за групами дослідження у трифакторній моделі; на графіку вказані межові значення Y для стадій ДР

Отримана модель була адекватною, скорегований коефіцієнт детермінації моделі  $R2_{\text{adjust}}=0,69$  (значення критерію Фішера  $F=96,2$ , відмінне від 1 при  $p<0,0001$ ). Оптимальні пороги Y для кожного класу становили: контроль – 1,23; для класу ДР0 – 1,36, для розмежування класів початкової/помірної НПДР (НПДР1+НПДР2) і тяжкої ДР (НПДР3+ПДР) – 2,71 (рис. 3).

Такий підхід дозволив покращити аналітичні характеристики та збільшити загальну точність прогнозу до 80% (СІ 72%-86%) (табл. 4).



**Рис. 3.** Межові значення прогнозу тяжкості ДР (Y, ум. од.) за об'єднаними групами дослідження у трифакторній моделі; на графіку вказані межові значення Y для об'єднаних стадій ДР

Таблиця 2

### Аналітичні характеристики трифакторної моделі прогнозу тяжкості ДР

Показник	Групи					
	Контроль	ДР0	НПДР1	НПДР2	НПДР3	ПДР
Чутливість, %	100	40,0	70,0	88,0	100	25
Специфічність, %	86,5	94,7	95,5	98,1	91,5	100
Точність, %	74% (ВІ 66% – 82%)					

Таблиця 3

**Багатофакторна модель логістичної регресії прогнозування тяжкості ДР після проведення бінаризації ДР-фенотипів**

Показник	Значення коефіцієнту моделі, $b \pm m$	Рівень значимості відмінності від 0	Коефіцієнт частинної кореляції	Дисперсійно-інфляційний фактор (VIF)
Константа	1,67±0,17	<0,0001		
NSE	0,039±0,005	<0,0001	0,235	2,53
IL-4	-0,130±0,024	<0,0001	0,280	1,87
IL-8	0,004±0,001	<0,0001	0,124	2,26

Таблиця 4

**Аналітичні характеристики трифакторної моделі прогнозу тяжкості ДР**

Показник	Групи			
	Контроль	ДР0	НПДР1+НПДР2	НПДР3+ПДР
Чутливість, %	96,0	40,0	80,0	87,5
Специфічність, %	86,5	93,9	93,8	100
Точність, %	80% (ВІ 72% – 86%)			

**ОБГОВОРЕННЯ**

Трифакторна модель, що була розроблена на основі концентрацій NSE, IL 4 та IL 8 у ВОР продемонструвала суттєву асоціацію з тяжкістю ДР. Високий скоригований коефіцієнт детермінації ( $R^2_{\text{adjust}}=0,84$ ) за одночасно низьких значень VIF (<3) свідчив про вагомий і взаємозалежний внесок кожного маркера. Перехід до клінічно релевантної бінаризації фенотипів (НПДР1+НПДР2 vs НПДР3+ПДР) підвищив інтегральну точність з 74%, отриману при багатокласовій класифікації, до 80%, а граничне значення  $Y=2,71$  виявилось практичним орієнтиром для відокремлення тяжкої ДР. Розраховані межі (по суті – діагностичні пороги) з високою точністю адаптували безперервний біомаркерний сигнал (вміст предикторів у ВОР) зі структурною дискретністю шкали ICDR (стадії ДР).

Отримані асоціації відповідали сучасним уявленням про єдність гіпоксично запального та нейродистрес компонентів у патобіології ДР [7]. HIF 1 $\alpha$ /HIF 2 $\alpha$  координують адаптацію сітківки до дефіциту кисню та гіперглікемії, змінюючи метаболізм, проникність мікросудин і ангиогенез, при цьому ролі їх ізоформ відрізняються часово етапною динамікою [27]. Доведеною є й концепція мікросудинної дестабілізації з втратою перичитів як ключового чинника порушення внутрішнього гематоретинального бар'єра [28, 29]. На цьому тлі IL-1 $\beta$ /IL 6/IL 8 у ВОР зростають і корелюють із тяжкістю ДР/ДМН, що посилює аргументацію щодо їхньої участі у бар'єрній дисфункції [13-16, 30, 31].

IL 4 має контррегуляторні ефекти: модулює мікроглію/перичити, підвищує стійкість нейросудинної одиниці та знижує проникність, що підтверджено на моделях

нейропротекції сітківки та ретинального пігментного епітелію [17, 32, 33]. Водночас NSE віддзеркалює нейронально гліальний дистрес, оскільки підвищення його рівня асоційоване з наявністю/тяжкістю ДР та іншими діабетичними ураженнями, що підтримує концепцію «нейронального континууму» [18-24, 34, 35]. У сукупності тріада змін концентрацій NSE, IL 8, IL 4 у ВОР в ході прогресування ДР репрезентує інтегральний континуум гіпоксії, запалення/ангіогенезу та нейродистресу, що і пояснює її предиктивну спроможність у нашій моделі.

Порівняння з літературою додатково підтримує обґрунтованість такого підходу. ВОР є найближчим до патологічного вогнища середовищем і демонструє вищу локальну чутливість порівняно з сироваткою [10, 11]. Прогрес у протеоміці ВОР розширює перелік маркерів стадієзалежних патологічних змін [36, 37]. З позицій морфологічної оцінки, показники ОКТА, які характеризують зони неперфузії, зокрема у глибокому капілярному сплетенні, є високочутливими до поступового прогресування НПДР та достовірно асоціюються зі зниженням функціональних показників зору, що дозволяє розглядати їх як зовнішній референтний критерій для калібрування запропонованої біохімічної моделі [4, 5, 38, 39].

Виключення HIF 1 $\alpha$  з остаточної моделі після *stepwise* відбору логічно пояснюється накладанням інформації з аспектами запально-ангіогенного каскаду (передусім із IL 8) та етапністю HIF сигналіngu. Продемонстровано протилежні ефекти HIF 1 $\alpha$  та HIF 2 $\alpha$  щодо регуляції IL 8 у ендотелії [40] і відмінні ролі ізоформ у гострій/хронічній гіпоксії [27]. Таким чином, статистична процедура могла «залишити» у рівнянні маркер пізнішої мікросудинної активності (IL 8), тоді як HIF 1 $\alpha$  може виконувати роль більш раннього і менш специфічного тригера.

Практична значущість моделі полягала у можливості ризик-адаптованого нагляду: значення  $Y \geq 2,71$  слугуватимуть тригером для інтенсифікації моніторингу і цільової ОКТА оцінки у пацієнтів підвищеного ризику

прогресії. Нижчі значення  $Y$  можуть підтримати стандартні інтервали спостереження, що збігалося з сучасними уявленнями про поступову еволюцію НПДР і розумінням ролі неперфузії як морфометричного предиктора її прогресування [38].

Перевагою проведеного дослідження є оцінка локального внутрішньоочного біохімічного середовища, що найбільш адекватно відображає метаболічні та запальні процеси у сітківці, а також використання чіткої статистичної методології, яка поєднує багатокласовий підхід на основі OVA-класифікації з клінічно релевантною бінарною стратифікацією фенотипів ДР. Водночас необхідно відзначити певні обмеження: одноцентровий поперечний дизайн, відносно невеликий обсяг вибірки та можливість впливу неконтрольованих системних чинників. Разом із тим, за даними сучасних оглядових робіт «рідинної біопсії», ВОР розглядається як перспективна інформативна матриця для персоніфікованого моніторингу офтальмопатій, зокрема ДР [41].

У подальших дослідженнях доцільно здійснити формування проспективних спостережних когорт із тривалим динамічним моніторингом пацієнтів і незалежною зовнішньою валідацією результатів, що дозволить простежити еволюцію біомаркерів у часі та підтвердити їхню прогностичну цінність. Також важливою є інтеграція біохімічних маркерів із ОКТА-метриками мікросудинної неперфузії для формування комплексних мультипараметричних моделей. Крім того, варто розширити панель досліджуваних біомаркерів шляхом включення додаткових компонентів HIF-залежного сигнального каскаду, а також ангіогенних і нейродистрес-асоційованих молекул, що дозволить поглибити розуміння патобіохімічних механізмів прогресування ДР та підвищити відтворюваність моделі, спираючись на багатовимірні дані протеомного профілю ВОР [37].

## ВИСНОВКИ

1. У ВОР зафіксовано виразні стадієзалежні

зсуви маркерів: HIF 1 $\alpha$  і NSE зростають зі ступінчастим профілем з прогресією ДР, у свою чергу IL 1 $\beta$  зростає монотонно, IL 6 різко підвищується на етапі НПДР3, а IL 8 досягає максимуму на НПДР3 з відносним зниженням у ПДР, тоді як IL 4 послідовно зменшується зі зростанням тяжкості ДР.

2. Покроковий відбір виокремив три незалежні предиктори (NSE, IL 4, IL 8). Модель є адекватною ( $R^2_{\text{adjust}}=0,84$   $p<0,001$ ) із позитивними внесками NSE/IL 8 та від'ємним – IL 4.
3. У багатокласовій OVA класифікації встановлено робочі пороги  $Y$  для стадій ДР: контроль 2,27; ДР0 2,48; НПДР1 3,14; НПДР2 4,52; НПДР3/ПДР 6,07; загальна точність становила 74% (95% ВІ: 66%-82%) з очікуваним перекриттям між суміжними класами НПДР.
4. Бінаризація фенотипів (НПДР1+НПДР2 vs НПДР3+ПДР) з порогом  $Y=2,71$  підвищила інтегральну точність до 80% (95% ВІ: 72%-86%); для групи НПДР3+ПДР отримано чутливість 87,5% і специфічність 100%.
5. Поріг  $Y\geq 2,71$  може бути застосований як критерій стратифікації ризику для інтенсифікації нагляду та цільового ОКТА моніторингу пацієнтів із високою ймовірністю тяжкої ДР. Запропонована модель доповнює структурні критерії ICDR у клінічному менеджменті.
6. Обмеження та наступні кроки: одноцентровий поперечний дизайн і розмір вибірки зумовлюють потребу у стандартизації преаналітики, зовнішній валідації та проспективних дослідженнях з клінічно значущими кінцевими точками й інтеграцією ОКТА метрик у комбіновані моделі.

## REFERENCES

1. GBD 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators; Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*. 2021 Feb;9(2):e144-e160. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7. Erratum in: *Lancet Glob Health*. 2021 Apr;9(4):e408. doi: 10.1016/S2214-109X(21)00050-4.
2. Duncan BB, Magliano DJ, Boyko EJ. IDF diabetes atlas 11th edition 2025: global prevalence and projections for 2050. *Nephrol Dial Transplant*. 2025 Aug 28;gfaf177. doi: 10.1093/ndt/gfaf177.
3. Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al.; Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003 Sep;110(9):1677-82. doi: 10.1016/S0161-6420(03)00475-5.
4. Ong JX, Konopek N, Fukuyama H, Fawzi AA. Deep Capillary Nonperfusion on OCT Angiography Predicts Complications in Eyes with Referable Nonproliferative Diabetic Retinopathy. *Ophthalmol Retina*. 2023 Jan;7(1):14-23. doi: 10.1016/j.oret.2022.06.018.
5. Nesper PL, Fawzi AA. Perfusion Deficits in Diabetes Without Retinopathy Localize to the Perivenular Deep Capillaries Near the Fovea on OCT Angiography. *Ophthalmol Sci*. 2024 Feb 1;4(5):100482. doi: 10.1016/j.xops.2024.100482.
6. Shinojima A, Lee D, Tsubota K, Negishi K, Kurihara T. Retinal Diseases Regulated by Hypoxia-Basic and Clinical Perspectives: A Comprehensive Review. *J Clin Med*. 2021 Nov 24;10(23):5496. doi: 10.3390/jcm10235496.
7. Lee D, Tomita Y, Miwa Y, Kunimi H, Nakai A, Shoda C, et al. Recent Insights into Roles of Hypoxia-Inducible Factors in Retinal Diseases. *Int J Mol Sci*. 2024 Sep 21;25(18):10140. doi: 10.3390/ijms251810140.
8. Gui F, You Z, Fu S, Wu H, Zhang Y. Endothelial Dysfunction in Diabetic Retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 4;11:591. doi: 10.3389/fendo.2020.00591.
9. Chu KO, Chan TI, Chan KP, Yip YW, Bakthavatsalam M, Wang CC, et al. Untargeted metabolomic analysis of aqueous humor in diabetic macular edema. *Mol Vis*. 2022 Aug 19;28:230-244.

10. Grochowski ET, Pietrowska K, Godlewski A, Gosk W, Buczynska A, Wojnar M, et al. Simultaneous Comparison of Aqueous Humor and Serum Metabolic Profiles of Diabetic and Nondiabetic Patients Undergoing Cataract Surgery-A Targeted and Quantitative Metabolomics Study. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 11;24(16):12671. doi: 10.3390/ijms241612671.
11. Dolar-Szczasny J, Drab A, Rejdak R. Biochemical Changes in Anterior Chamber of the Eye in Diabetic Patients-A Review. *J Clin Med.* 2024 Apr 27;13(9):2581. doi: 10.3390/jcm13092581.
12. Lytvynenko TV. Hypoxiainducible factor- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and progression of diabetic retinopathy. *Medical Science of Ukraine.* 2025;3(21):76-84. <https://doi.org/10.32345/2664-4738.3.2025.08>.
13. Wu H, Hwang DK, Song X, Tao Y. Association between Aqueous Cytokines and Diabetic Retinopathy Stage. *J Ophthalmol.* 2017;2017:9402198. doi:10.1155/2017/9402198.
14. Wu J, Zhong Y, Yue S, Yang K, Zhang G, Chen L, et al. Aqueous Humor Mediator and Cytokine Aberrations in Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers.* 2019 Nov 23;2019:6928524. doi: 10.1155/2019/6928524.
15. Weaver JR, Odanga JJ, Breathwaite EK, Treadwell ML, Murchinson AC, Walters G, et al. An increase in inflammation and islet dysfunction is a feature of prediabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2021 Sep;37(6):e3405. doi: 10.1002/dmrr.3405.
16. Yue T, Shi Y, Luo S, Weng J, Wu Y, Zheng X. The role of inflammation in immune system of diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Front Immunol.* 2022 Dec 13;13:1055087. doi: 10.3389/fimmu.2022.1055087.
17. Yun JH. Interleukin-4 prevents increased endothelial permeability by inducing pericyte survival and modulating microglial responses in diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2025 Jul 2;16:1609796. doi: 10.3389/fendo.2025.1609796.
18. Isgrò MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:125-43. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0\_9.
19. Babkina AS, Lyubomudrov MA, Golubev MA, Pisarev MV, Golubev AM. Neuron-Specific Enolase-What Are We Measuring? *Int J Mol Sci.* 2024 May 6;25(9):5040. doi: 10.3390/ijms25095040.
20. Dunker S, Sadun AA, Sebag J. Neuron specific enolase in retinal detachment. *Curr Eye Res.* 2001 Nov;23(5):382-5. doi: 10.1076/ceyr.23.5.382.5446.
21. Shine BS, Hungerford J, Vaghela B, Sheraidah GA. Electrophoretic assessment of aqueous and serum neurone-specific enolase in retinoblastoma and ocular malignant melanoma. *Br J Ophthalmol.* 1990 Jul;74(7):427-30. doi: 10.1136/bjo.74.7.427.
22. Nakajima T, Kato K, Kaneko A, Tsumuraya M, Morinaga S, Shimosato Y. High concentrations of enolase, alpha- and gamma-subunits, in the aqueous humor in cases of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol.* 1986 Jan 15;101(1):102-6. doi: 10.1016/0002-9394(86)90471-x.
23. Oh JW, Ahn SJ, Jung JH, Kim TW, Kim KP. Proteomic Analysis of Aqueous Humor Identified Clinically Relevant Molecular Targets for Neovascular Complications in Diabetic Retinopathy. *Mol Cell Proteomics.* 2025 Apr;24(4):100953. doi: 10.1016/j.mcpro.2025.100953.
24. Wang T, Chen H, Li N, Zhang B, Min H. Aqueous humor proteomics analyzed by bioinformatics and machine learning in PDR cases versus controls. *Clin Proteomics.* 2024 May 19;21(1):36. doi: 10.1186/s12014-024-09481-w.
25. Gur'yanov VG, Lyakh YuE, Parii VD, Korotky OV, Chalyy OV, Chalyy KO, Tsekhmister YaV. Handbook of biostatistics. Analysis of the results of medical research in the EZR (R-statistics) package. Kyiv: Vistka. 2018:208 [Ukrainian].
26. Brownlee J. One-vs-Rest and One-vs-One for Multi-Class Classification [Internet]. *Machine Learning Mastery*; 2021 [cited 2025 November 3]. Available from: <https://machinelearningmastery.com/one-vs-rest-and-one-vs-one-for-multi-class-classification>.
27. Bakleh MZ, Al Haj Zen A. The Distinct Role of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in Hypoxia and Angiogenesis. *Cells.* 2025 May 4;14(9):673. doi: 10.3390/cells14090673.

28. D'Esposito F, Cappellani F, Visalli F, Capobianco M, Rapisarda L, Avitabile A, et al. Pericytes as Key Players in Retinal Diseases: A Comprehensive Narrative Review. *Biology (Basel)*. 2025 Jun 20;14(7):736. doi: 10.3390/biology14070736.
29. Sheng X, Zhang C, Zhao J, Xu J, Zhang P, Ding Q, et al. Microvascular destabilization and intricated network of the cytokines in diabetic retinopathy: from the perspective of cellular and molecular components. *Cell Biosci*. 2024 Jun 27;14(1):85. doi: 10.1186/s13578-024-01269-7.
30. Kwon JW, Kim B, Jee D, Cho YK. Aqueous humor analyses of diabetic macular edema patients with subretinal fluid. *Sci Rep*. 2021 Oct 25;11(1):20985. doi: 10.1038/s41598-021-00442-z. Erratum in: *Sci Rep*. 2022 Jan 18;12(1):1205. doi: 10.1038/s41598-022-05477-4.
31. Goma AR, Bedda AM, ElGoweini HF, Taleb RSZ, Saleh AMA. Study of aqueous humour inflammatory mediators' levels in a cohort of Egyptian patients with diabetic macular oedema. *BMC Ophthalmol*. 2023 Nov 14;23(1):456. doi: 10.1186/s12886-023-03192-w.
32. Zuo Z, Fan B, Zhang Z, Liang Y, Chi J, Li G. Interleukin-4 protects retinal ganglion cells and promotes axon regeneration. *Cell Commun Signal*. 2024 Apr 22;22(1):236. doi: 10.1186/s12964-024-01604-y.
33. Zhou T, Yang Z, Ni B, Zhou H, Xu H, Lin X, et al. IL-4 induces reparative phenotype of RPE cells and protects against retinal neurodegeneration via Nrf2 activation. *Cell Death Dis*. 2022 Dec 20;13(12):1056. doi: 10.1038/s41419-022-05433-0.
34. Yu ZW, Liu R, Li X, Wang Y, Fu YH, Li HY, et al. High Serum Neuron-Specific Enolase Level Is Associated with Mild Cognitive Impairment in Patients with Diabetic Retinopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Apr 24;13:1359-1365. doi: 10.2147/DMSO.S249126.
35. Li J, Yan M, Zhang Y, Xie M, Yan L, Chen J. Serum neuron-specific enolase is elevated as a novel indicator of diabetic retinopathy including macular oedema. *Diabet Med*. 2015 Jan;32(1):102-7. doi: 10.1111/dme.12597.
36. Beutgen VM, Graumann J. Advances in aqueous humor proteomics for biomarker discovery and disease mechanisms exploration: a spotlight on primary open angle glaucoma. *Front Mol Neurosci*. 2024 Apr 24;17:1397461. doi: 10.3389/fnmol.2024.1397461.
37. Jin Y, Liu J, Zhang X, Zhang L, Cui Y, Luo X, et al. Stage-dependent proteomic alterations in aqueous humor of diabetic retinopathy patients based on data-independent acquisition and parallel reaction monitoring. *J Transl Med*. 2025 Apr 25;23(1):476. doi: 10.1186/s12967-025-06452-z.
38. Marques IP, Reste-Ferreira D, Santos T, Mendes L, Martinho AC, Yamaguchi TCN, et al. Progression of Capillary Hypoperfusion in Advanced Stages of Nonproliferative Diabetic Retinopathy: 6-month Analysis of RICHARD Study. *Ophthalmol Sci*. 2024 Oct 16;5(2):100632. doi: 10.1016/j.xops.2024.100632.
39. Castellanos-Canales D, Duffy BV, Decker NL, Yamaguchi TC, Pearce E, Fawzi AA. Relationship of Deep Capillary Plexus Non-perfusion to Visual Acuity and Low Light Vision in Diabetic Retinopathy through OCTA Analysis. *Retina*. 2025 May 27. doi: 10.1097/IAE.0000000000004517.
40. Florczyk U, Czauderna S, Stachurska A, Tertel M, Nowak W, Kozakowska M, et al. Opposite effects of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  on the regulation of IL-8 expression in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2011 Nov 15;51(10):1882-92. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.023.
41. Chen Q, Chen Y, Mou K, Zhang M. Liquid Biopsy Combined with Multi-Omics Approaches in Diagnosis, Management, and Progression of Diabetic Retinopathy. *Biomedicines*. 2025 May 26;13(6):1306. doi: 10.3390/biomedicines13061306.

## MODEL FOR PREDICTION OF DIABETIC RETINOPATHY SEVERITY BASED ON DETERMINATION OF OCCUPATIONAL BIOMARKERS

*Lytvynenko T. V.*

*Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine*

**Background.** Local profiling of the aqueous humor (AH) captures key pathobiological axes of diabetic retinopathy (DR) – hypoxia, inflammation, and neuro glial distress. The combination of markers from these biological axes within a multifactorial model may enhance the accuracy of risk stratification and provide a rationale for subsequent individualized patient management.

**Aim:** to quantify hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ), interleukins (IL 1 $\beta$ , IL 4, IL 6, IL 8), and neuron specific enolase (NSE) in AH and assess their association with DR severity; and to evaluate the analytical utility of a multivariable predictive model for stratifying patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

**Materials and methods.** We examined 110 patients with T2DM, grouped by the International Clinical Diabetic Retinopathy (ICDR, 2003) scale: DR0 (n=15), mild nonproliferative DR (NPDR1; n=40), moderate NPDR (NPDR2; n=25), severe NPDR (NPDR3; n=12), and proliferative DR (PDR; n=18). Controls were 25 age and sex matched individuals without T2DM/DR. AH (0.1 mL) was obtained during phacoemulsification; HIF 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 4, IL 6, IL 8 (pg/mL) and NSE (mg/mL) were measured by ELISA. Statistical analysis: EZR v1.54; nonparametric tests; multivariable regression with stepwise selection; multiclass One vs All (OVA) classification using the Youden index; and clinically relevant binary phenotyping.

**Results.** Stepwise selection identified three independent predictors of DR severity – NSE and IL 8 (direct associations) and IL 4 (inverse association). Model performance was adequate:  $R^2_{\text{adjust}}=0.84$ ,  $F=219.5$ ,  $p<0.001$ ;  $VIF<3$  for all coefficients. In multiclass OVA classification, stage specific thresholds of the model output Y (arbitrary units) were: control 2.27; DR0 2.48; NPDR1 3.14; NPDR2 4.52; NPDR3/PDR 6.07; overall accuracy 74% (95% CI: 66%-82%). Binary stratification (NPDR1+NPDR2 vs NPDR3+PDR) using  $Y=2.71$  improved overall accuracy to 80% (95% CI: 72%-86%); for the NPDR3+PDR group, sensitivity 87.5% and specificity 100% were achieved. Although HIF 1 $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , and IL 6 showed stage dependent trends, they did not enhance the model's aggregate predictive performance once NSE/IL 8/IL 4 were included.

**Conclusion.** A three marker AH model based on NSE, IL 8, and IL 4 can predict DR severity and yields both multiclass and binary thresholds suitable for clinical application. A threshold of  $Y\geq 2.71$  can serve as a risk triage criterion to intensify follow up and trigger targeted optical coherence tomography angiography (OCTA) monitoring in patients at high risk of severe DR.

**Key words:** diabetic retinopathy; type 2 diabetes mellitus; aqueous humor; hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ; interleukin 4; interleukin 8; neuron specific enolase; biomarkers; risk stratification.