

УДК: 617.735-02:616.379-008.64]-056.7

DOI: 10.24026/1818-1384.2(58).2017.105570

МОЖЛИВА РОЛЬ ПОЛІМОРФІЗМІВ RS759853 І RS9640883 ГЕНА AKR1B1 ПРИ ДІАБЕТИЧНІЙ РЕТИНОПАТІЇ І ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2 ТИПУ



**С.В. Зяблицев¹, С.Ю. Могілевський², О.В. Бушуєва³,
О.П. Чернобривцев⁴**

¹ Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

² Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Київ

³ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів

⁴ Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ

ВСТУП

У розвитку діабетичної ретинопатії (ДР) при цукровому діабеті 2 типу (ЦД2Т) значну роль відіграють генетичні чинники [1-4]. Відповідно до сучасних даних, генетичним факторам відводять до 50% ризику розвитку ДР. Генетичні чинники можна вважати есенціальними факторами виникнення ускладнень цукрового діабету, зокрема – ДР [5, 6]. Рядом досліджень показана наявність спадковості при розвитку ДР в різних популяціях, незалежно від рівня гіперглікемії та супутніх факторів ризику навколишнього середовища [7, 8].

Патогенез ДР включає багато факторів і, в першу чергу – порушення обміну речовин: вуглеводного, ліпідного, білкового та електролітного. Тривала гіперглікемія активує поліоловий шлях метаболізму глюкози, внаслідок чого у клітинах накопичуються сорбітол та фруктоза. При відсутності гіперглікемії перетворення глюкози на сорбітол не перевищує 1%, але при ЦД2Т цей відсоток збільшується до 7-8%. Ключовим ферментом поліолового шляху є альдозоредуктаза, яка перетворює глюкозу на сорбітол. Активація цього ферменту спричиняє порушення внутрішньоклітинного гомеостазу, оскільки кінцеві продукти метаболізму глюкози за сорбітоловим шляхом (сорбітол та фруктоза) не проникають через клітинну мембрану і

накопичуються в клітинах, спричиняють набряк, що призводить до загибелі клітини через механізм осмотичного лізису [8, 9]. Отже дослідження впливу генетичних поліморфізмів, які впливають на активність альдозоредуктази (rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1) є актуальним та сучасним.

Мета роботи: з'ясувати можливу роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 на підставі порівняння розподілу генотипів та алелей в контрольній групі та у хворих з ЦД2Т та ДР.

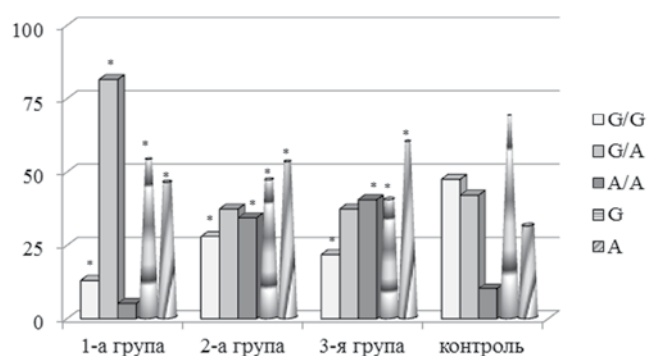
Матеріал і методи. Дане дослідження проведено на базі кафедри офтальмології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Контрольну групу склали 98 пацієнтів, які не мали ЦД2Т та іншої офтальмопатології. Першу групу склали 76 пацієнтів із I стадією ДР (без видимих змін на очному дні). Другу групу склали 64 пацієнти зі встановленим діагнозом непроліферативної ДР (ДНПР), а третю – 64 пацієнти зі встановленою проліферативною ДР (ДПР). Офтальмологічні дослідження включали загальний огляд і біомікроскопічне дослідження захисного апарату, переднього та заднього відрізків ока, яке виконували за допомогою щілинної лампи (Haag-Streit BQ 900, Swiss) та лінзи для біомікроскопії (Super Pupil XL, Volk Optical, USA). Аналіз поліморфних ДНК-локусів здійснювали з використанням уніфікованих

Зяблицев Сергій Володимирович д. мед. н., професор кафедри патофізіології, м. Київ, просп. Перемоги, 34, корпус 2, E-mail : zsv1965@gmail.com; С.Ю. Могілевський д. мед. н., професор кафедри офтальмології, E-mail: sergey.mogilevsky@gmail.com; О.В. Бушуєва асистент кафедри сімейної медицини факультету післядипломної освіти; О.П. Чернобривцев лікар-лаборант

тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США). Поліморфізм rs759853 гена AKR1B1 має локалізацію Chr. 7:134143958 за NCBI Build 37. Цей поліморфізм представляє собою просту нуклеотидну заміну G на A у інtronі гена AKR1B1 (за NM_001628.2: с.-144 С>Т). Предковою алеллю є алель G, мінорною – алель A, загальна частота якої складає A=0,2768 за даними MAF Source: 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>). Поліморфізм rs9640883 гена AKR1B1 має локалізацію Chr.7:134116633 за NCBI Build 37. Цей поліморфізм представляє собою просту нуклеотидну заміну G на A у інtronі гена AKR1B1 (за XR_928003.1: n.94+433 С>Т). Предковою алеллю є алель G, мінорною – алель A, загальна частота якої складає A=0,2853 за даними MAF Source: 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>). Статистичний аналіз результатів досліджень проводили за допомогою пакета програм SPSS 11.0, MedStat (Лях Ю.Є., Гур'янов В.Г., 2004-2012), MedCalc (MedCalc Software bvba, 1993-2013). У всіх випадках проведення аналізу критичний рівень значущості був прийнятий рівним 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Генотип G/G поліморфізму rs759853 домінував у осіб контрольної групи (склав 47,6%) (рис. 1) За наявності ЦД2Т його частота знижувалася (склала 13,1% – в 1-й групі; 28,1% – в 2-й групі та 21,9% – в 3-й групі; $p_{Fet}<0,05$ у всіх випадках). Тобто можна було стверджувати, що при ЦД2Т мав місце перерозподіл частоти предкового генотипу у бік значного зниження, яке максимальною мірою виявилось у 1-й групі (у 3,6 рази).



Примітка: * – значущість різниць частот між групами за точним критерієм Фішера ($p_{Fet}<0,05$).

Рис. 1. Розподіл генотипів та алелей поліморфізму rs759853 гена AKR1B1 по групам хворих (у відсотках до кількості осіб у даній групі).

Частота гетерозиготного генотипу G/A у порівнянні з контролем була більшою у пацієнтів 1-ї групи: 42,1% проти 81,6% ($p_{Fet}<0,05$). Частоти розподілу генотипу G/A у пацієнтів 2-ї та 3-ї груп не відрізнялися від контролю (у обох групах 37,5% проти 42,1% у контролі). Тобто рівень гетерозиготності при ЦД2Т без проявів ретинопатії суттєво збільшувався (у 1,9 рази), тоді як за наявності ДР різниці з контролем не було.

Аналіз розподілу мінорного, по суті генетичних подій, – мутантного генотипу A/A показав наступне. У групах з ДР частота мутантного генотипу виявилася суттєво збільшеною у порівнянні з контролем: у 2-й групі – 34,4% і у 3-й – 40,6% проти 10,3% у контролі. Тобто при наявності ДР значно зростає (у 3,3 рази при ДНПР та, більшою мірою, – у 3,9 рази при ДПР) частота мутантної гомозиготи A/A.

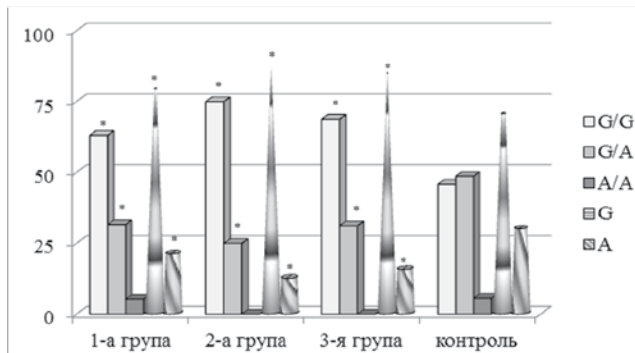
Отже, збільшення частоти гетерозиготи супроводжувало розвиток ЦД2Т без ретинопатії, тоді як збільшення частоти мутантної гомозиготи – розвиток ДР, й більшою мірою – проліферативного її варіанту.

Частота предкової алелі G поліморфізму rs759853 у осіб контрольної групи склала 68,7% (див. рис. 1) У групах хворих була відзначена чітка тенденція до зменшення частоти цієї алелі: 53,9% – в 1-й групі; 46,9% – в 2-й групі та 40,2% – в 3-й групі ($p_{Fet}<0,05$ у всіх випадках). Тобто можна було стверджувати, що за умов прогресування ДР знижувалася частота предкової алелі G, з мінімальним значенням у хворих з ДПР (нижче, ніж у контролі у 1,7 рази). Частота мутантної алелі A у порівнянні з контролем (31,3%) навпаки, статистично значуще збільшувалася та склала: 46,1% – в 1-й групі; 53,1% – в 2-й групі та 59,8% – в 3-й групі ($p_{Fet}<0,05$ у всіх випадках). Максимальне значення також виявилось у хворих з ДПР (вище, ніж у контролі у 1,9 рази).

Отже, у хворих за умов наростання тяжкості патологічного процесу та прогресування ДР відзначена чітка закономірність – зниження частоти предкової алелі G та збільшення частоти мутантної алелі A поліморфізму rs759853 гена AKR1B1.

Дані стосовно іншого поліморфізму rs9640883 гена AKR1B1 наведено на рис. 2. Предкова гомозигота G/G поліморфізму rs9640883 зустрічалася майже у половини обстежених з контрольної групи (45,8%). У хворих всіх груп було відзначено збільшення частоти цього генотипу, що було статистично значущим. Так, у 1-й групі частота склала 63,1% (була збільшена у порівнянні з контролем у 1,4 рази), у 2-й групі – 75,0% (збільшена – у 1,6 рази) та у 3-й

групі – 68,8% (збільшена – у 1,5 рази; $p_{Fet} < 0,05$ у всіх випадках). Тобто при ЦД2Т суттєво (у 1,4-1,6 рази) збільшувалася частота предкового генотипу G/G.



Примітка: * – значущість різниць частот між групами за точним критерієм Фішера ($p_{Fet} < 0,05$)

Рис.2. Розподіл генотипів та алелей поліморфізму rs9640883 гена AKR1B1 по групам хворих (у відсотках до кількості осіб у даній групі).

Частота гетерозиготного генотипу G/A у порівнянні з контролем була статистично значуще менша у всіх групах хворих: у 1,5-1,9 рази ($p_{Fet} < 0,05$ у всіх випадках). Отже рівень гетерозиготності за наявності ЦД2Т був вірогідно зниженим. Частота мінорного генотипу A/A цього поліморфізму і у контрольній групі була досить низкою (5,6%); у 1-й групі вона статистично значуще не відрізнялася від показників у контролі (відповідно, 5,6% та 5,3%), тоді як у групах з ДР гомозиготний генотип за мінорною алеллю не зустрічався жодного разу ($n=128$). Тобто можна було припустити наявність протективного ефекту по відношенню до розвитку ДР гомозиготного носійства A/A цього поліморфізму.

Частота предкової алелі G поліморфізму rs9640883 у обстежених з контрольної групи склала 70,1%. При цьому у групах хворих була відзначена чітка тенденція до збільшення частоти цієї алелі: 78,9% – в 1-й групі; 87,5% – в 2-й групі та 84,4% – в 3-й групі ($p_{Fet} < 0,05$ у всіх випадках). Частота мутантної алелі A у порівнянні з контролем (29,9%) статистично значуще зменшувалася і склала в 1-й групі – 21,1%; в 2-й групі – 12,5% і в 3-й групі – 15,6%.

Таким чином, у хворих при наростанні тяжкості патологічного процесу та прогресуванні ДР відзначена чітка закономірність – збільшення частоти предкової алелі G та зменшення частоти мутантної алелі A поліморфізму rs9640883 гена AKR1B1. Враховуючи, що гомозиготний генотип за мутантною алеллю A/A взагалі не виявлявся у хворих на ДР, можна було обґрунтувати ідею про

те, що мінорна алель A має протективну роль у розвитку ДР.

На рисунку 3 наведена порівняльна характеристика частоти мінорних алелей (A) для обох поліморфізмів.

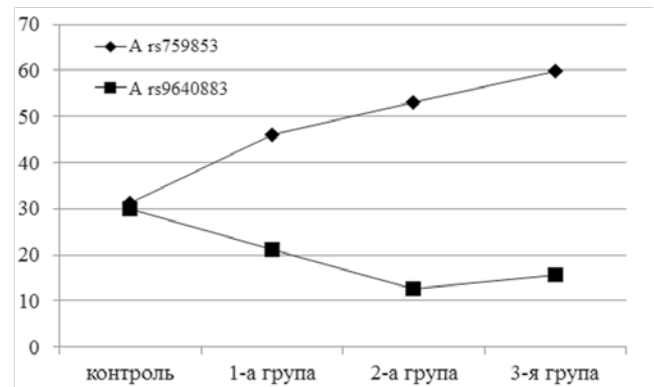


Рис.3. Порівняльна динаміка частоти мінорних алелей (A) поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1; значущість різниць частот між контролем та групами за точним критерієм Фішера на рівні $p_{Fet} < 0,05$ для всіх спостережень.

У контролі обидві алелі мали приблизно однакову частоту: 31,3% для поліморфізму rs759853 і 29,9% для поліморфізму rs9640883. У міру збільшення тяжкості патологічного процесу у ряду ЦД без ретинопатії → ДНПР → ДПР частота мінорної алелі поліморфізму rs759853 поступово збільшувалася (до максимуму при ДПР – 59,8%), що дозволяло розглядати її як маркер тяжкості патологічного процесу та, одночасно, висвітлювало її роль як етіологічного фактора у виникненні ураження ока при ЦД2Т.

Частота алелі A поліморфізму rs9640883 навпаки поступово зменшувалася (до мінімуму при ДНПР та ДПР, відповідно, 12,5% та 15,6%). Тобто цю алель можна розглядати як протективну по відношенню до розвитку патологічного процесу. Підтвердженням останнього положення є факт про відсутність гомозигот за мінорною алеллю A/A поліморфізму rs9640883 серед усіх хворих на ДР (у даному дослідженні – 128 осіб).

ВИСНОВКИ

1. Збільшення частоти гетерозиготи G/A поліморфізму rs759853 супроводжувало розвиток ЦД2Т без ретинопатії; збільшення частоти мутантної гомозиготи A/A супроводжувало розвиток ДР, й більшою мірою – проліферативного її варіанту. Загалом, при наростанні тяжкості патологічного процесу та прогресуванні ДР відмічена чітка

закономірність – зниження частоти предкової алелі G та збільшення частоти мутантної алелі A поліморфізму rs759853 гена AKR1B1, яку можна було вважати фактором ризику розвитку ДР.

2. При наростанні тяжкості патологічного процесу та прогресуванні ДР відмічена чітка закономірність – збільшення частоти предкової алелі G та зменшення частоти мутантної алелі A поліморфізму rs9640883 гена AKR1B1. Гомозиготний генотип за мутантною алеллю A/A взагалі не виявлявся у хворих на ДР, що обґрунтовувало ідею про протективне значення мінорної алелі A у розвитку ДР.

ЛІТЕРАТУРА REFERENCES

1. *Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE.* A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2009 Sep;58(9):2137-47.
2. *Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):881-5.
3. *Hallman DM, Huber JC Jr, Gonzalez VH, et al.* Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care.* 2005 May;28(5):1163-8.
4. *Liew G, Klein R, Wong TY.* The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. *Int Ophthalmol Clin.* 2009 Spring;49(2):35-52.
5. *Pankiv VI.* Symposium N162 "Tsukrovyyi diabet: diahnostychni kryterii, etiolohiia i patohenez [Symposium No 162 "Diabetes mellitus: diagnostic criteria, etiology and pathogenesis"]. *Mizhnarodnyi Endokrynolohichnyi Zhurnal.* 2013;8:53-64. [Ukrainian].
6. *Cho H, Sobrin L.* Genetics of diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2014 Aug;14(8):515.
7. *Hietala K, Forsblom C, Summanen P, et al.* Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2008 Aug;57(8):2176-2180.
8. *Zhang X, Gao Y, Zhou Z, et al.* Familial clustering of diabetic retinopathy in Chongqing, China, Type 2 Diabetic Patients. *Eur J Ophthalmol.* 2010;20(5):911-918.
9. *Suzen S, Buyukbingol E.* Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications. *Curr Med Chem.* 2003 Aug;10(15):1329-52.

РЕЗЮМЕ

Можлива роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 при діабетичній ретинопатії і цукровому діабеті 2 типу

С.В. Зяблицев, С.Ю. Могілевський, О.В. Бушуєва, О.П. Чернобривцев

Мета роботи: з'ясувати можливу роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 на підставі порівняння розподілу генотипів та алелей в контрольній групі та у хворих із цукровим діабетом 2 типу та діабетичною ретинопатією (ДР).

Матеріал і методи. Досліджено 302 пацієнти, з яких контрольну групу склали 98; 1-у групу – 76 пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу без видимих змін на очному дні; 2-у групу – 64 пацієнти з непроліферативною ДР і 3-ю – 64 пацієнти з проліферативною ДР. Аналіз поліморфних локусів здійснювали з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США). Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою пакета програм SPSS 11.0, MedStat, MedCalc (MedCalc SoftWare bvba, 1993-2013).

Результати та обговорення. Встановлено, що при цукровому діабеті 2 типу без ретинопатії мало місце значне збільшення частоти гетерозиготи G/A поліморфізму rs759853 при порівнянні з контролем, тоді як розвиток ДР супроводжувався збільшенням частоти мутантної гомозиготи A/A, особливо – при проліферативній ДР. При прогресуванні ДР відзначено значне зниження частоти алелі G та збільшення частоти алелі A поліморфізму rs759853 гена AKR1B1. При прогресуванні ДР відзначено також збільшення частоти алелі G та зменшення частоти алелі A поліморфізму rs9640883 гена AKR1B1. Гомозиготний генотип за мутантною алеллю A/A rs9640883 взагалі не виявлявся у хворих на ДР, що обґрунтовувало ідею про протективне значення мінорної алелі A у розвитку ДР.

Висновки. Проведене дослідження показало роль поліморфізмів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1. Факторами, що сприяли прогресії ДР, були наростання частоти алелей A rs759853 та G rs9640883; протективну роль мали алель A та генотип A/A rs9640883.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, діабетична ретинопатія, rs759853, rs9640883, AKR1B1.

РЕЗЮМЕ

Возможная роль полиморфизмов rs759853 и rs9640883 гена AKR1B1 при диабетической ретинопатии и сахарном диабете 2 типа**С.В. Зяблицев, С.Ю. Могилевский, О.В. Бушуйева, А.П. Чернобривцев**

Цель работы: выяснить возможную роль полиморфизмов rs759853 и rs9640883 гена AKR1B1 путем сравнения распределения генотипов и аллелей в контрольной группе и у больных с сахарным диабетом 2 типа и диабетической ретинопатией (ДР).

Материал и методы. Обследованы 302 пациента, из которых контрольную группу составили 98; 1-ю группу – 76 пациентов с сахарным диабетом 2 типа без видимых изменений на глазном дне; 2-ю группу – 64 пациента с непролиферативной ДР и 3-ю – 64 пациента с пролиферативной ДР. Анализ полиморфных локусов осуществляли с использованием унифицированных тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США). Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ SPSS 11.0, MedStat, MedCalc (MedCalc SoftWare bvba, 1993-2013).

Результаты и обсуждение. Установлено, что при сахарном диабете 2 типа без ретинопатии имело место значительное увеличение частоты гетерозиготы G/A полиморфизма rs759853 по сравнению с контролем, тогда как развитие ДР сопровождалось увеличением частоты мутантной гомозиготы A/A, особенно – при пролиферативной ДР. При прогрессировании ДР отмечено значительное снижение частоты аллели G и увеличение частоты аллели A полиморфизма rs759853 гена AKR1B1. При прогрессировании ДР отмечено также увеличение частоты аллели G и уменьшение частоты аллели A полиморфизма rs9640883 гена AKR1B1. Гомозиготный генотип по мутантной аллели A/A rs9640883 вообще не выявлялся у больных с ДР, что обосновывало идею о протективном значении минорной аллели A в развитии ДР.

Выводы. Проведенное исследование показало роль полиморфизмов rs759853 и rs9640883 гена AKR1B1. Факторами, которые способствовали прогрессии ДР, были нарастание частоты аллелей A rs759853 и G rs9640883; протективная роль принадлежала аллели A и генотипу A/A rs9640883.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, диабетическая ретинопатия, rs759853, rs9640883, AKR1B1.

SUMMARY

Possible role of rs759853 and rs9640883 polymorphisms of the AKR1B1 gene in diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus**Ziablitsev SV, Mogilevskyy SYu, Bushuyeva OV, Chernobrivtsev AP**

Aim: to find out a possible role of rs759853 and rs9640883 polymorphisms of AKR1B1 gene by comparison of genotypes and alleles distribution in control group and patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy (DR).

Material and methods. 302 patients of whom the control group was made by 98 were investigated; the 1st group – 76 patients with type 2 diabetes mellitus without visible changes on eyeground; the 2nd group – 64 patients with non-proliferative DR and the 3rd – 64 patients with proliferative DR. The analysis of polymorphic loci was carried out with use of the unified TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific test systems (USA). The statistical analysis of results was carried out by means of the software package of SPSS 11.0, MedStat, MedCalc (MedCalc SoftWare bvba, 1993-2013).

Results and discussion. It was established that at type 2 diabetes mellitus without retinopathy significant increase in frequency of heterozygote G/A rs759853 in comparison with control took place whereas development of DR was accompanied with increase of frequency of mutant homozygote A/A, especially – at proliferative DR. At advanced DR appreciable decrease of allele G frequency and increase of allele A frequency rs759853 AKR1B1 was noted. Also at advanced DR the increase of allele G frequency and decrease of allele A frequency rs9640883 AKR1B1 was noted. The homozygous genotype on mutant allele A/A rs9640883 wasn't found in patients with DR at all that proved the idea about protective value of minor allele A in DR development.

Conclusions. The conducted research showed a role of rs759853 and rs9640883 polymorphisms of AKR1B1 gene. Promotion factors of DR progression were frequency increase of alleles A rs759853 and G rs9640883; the protective role belonged to allele A and to genotype A/A rs9640883.

Keywords: diabetes mellitus 2 types, diabetic retinopathy, rs759853, rs9640883, AKR1B1.

Дата надходження до редакції 22.03.2017 р.