

Питання клінічної офтальмології

УДК 617.735-02 :616.379-008.64-036.17:575.17

Роль поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу

С. О. Риков ¹, д-р мед. наук, професор; Ю. Прокопенко ¹, аспірант;
Л. В. Натрус ², д-р мед. наук, професор; Ю. О. Панченко ¹, д-р мед. наук, доцент

¹ Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика

² Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
Київ (Україна)

Актуальність. Однією з ланок патогенезу діабетичної ретинопатії (ДР) при цукровому діабеті 2 типу (ЦД2) є ендотеліальна дисфункція, в розвитку якої має значення гіпергомоцистеїнемія. Провідна причина накопичення гомоцистеїну полягає в недостатній кількості та/або дисфункції ферментів і кофакторів, пов'язаних з його метаболізмом. Основу цього складає генетично детермінований дефіцит ферментів фолатного циклу, визначений поліморфізмами генів MTHFRC677T, MTHFRA1298C, MTRA2756G.

Мета роботи – вивчення ролі поліморфізмів генів ферментів фолатного циклу MTHFRC677T, MTHFRA1298C, MTRA2756G у прогресуванні діабетичної ретинопатії пацієнтів на цукровий діабет 2 типу

Матеріал та методи. Дослідження включало 83 хворих (83 ока) із ЦД2, у яких за результатами офтальмологічного обстеження за шкалою ETDRS виявлено не-проліферативну та проліферативну ДР. Контрольна група (КГ) включала 35 осіб без ЦД, які зіставлені із пацієнтами за статтю, віком, індексом маси тіла. Поліморфізм гену визначали за допомогою ПЛР-реал тайм на автоматичному ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500, вміст L-гомоцистеїну визначали в сироватці крові методом ELISA за допомогою набору AXIS-SHIELD DIAGNOSTICS LTD.

Висновки. Не виявлений зв'язок поліморфізмів основних генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що кодують ферменти фолатного циклу із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету. У носіїв мінорних гомозиготних генотипів: GG гену MTR 2756A/G і генотипу CC гену MTHFR 1298 A/C виявлене суттєве підвищення рівня гомоцистеїну в крові на початку розвитку ДР, що потребує подальшого з'ясування ролі гіпергомоцистеїнемії як чинника прогресування ускладнення, або маркера ступеню ушкодження тканин. У носіїв найбільш розповсюджених генотипів CC та CT гену rs1801133, генотипу AG гену rs1805087, і генотипу AA гену rs1801131 більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2.

Ключові слова:

діабетична ретинопатія, цукровий діабет 2 типу, фолатний цикл, гомоцистеїн

Вступ. Діабетична ретинопатія (ДР) залишається основною причиною втрати зору у дорослих працездатного віку і проблема не втрачає актуальності. Активно вивчаються усі патогенетичні ланки мікросудинних ускладнень цукрового діабету 2 типу (ЦД2): від системного впливу факторів харчування, способу життя, генетичної схильності, порушення молекулярних механізмів, що забезпечують стан ліпідного обміну тощо, які викликають зміни метаболізму і призводять до поглиблення ЦД2 [1-3], до вивчення молекулярних механізмів біохімічного впливу гіперглікемії, окислювального стресу, порушення гомеостазу, зміни транскрипції генів, пов'язаних з окислювальним стресом,

прискоренням апоптозу ендотелію, ролі мітохондріальної дисфункції [4]. Але незважаючи на активний пошук і дослідження в цій галузі, молекулярний механізм цього багатофакторного захворювання досі не зрозумілий [4, 5].

Експериментальні та клінічні дослідження довели, що пацієнти з ЦД2 і тваринні моделі мають підвищений рівень гомоцистеїну, як того що циркулює в крові, так і того що накопичується в тканинах [6-8]. Високі рівні гомоцистеїну є доволі небезпечним фактором і призводять до розвитку ендотеліальної дисфункції,

мікросудинних ускладнень, (ретинопатію, нефропатію, кардіоміопатію та нейропатію), оскільки гомоцистеїн викликає порушення структури ендотеліальних клітин, гематоенцефалічного бар'єру, призводить до ішемії та неоваскуляризації сітківки, підвищення рівня фактора росту ендотелію судин (VEGF), активації стресу ендоплазматичного ретикулуму та окисного стресу [9]. Сьогодні гомоцистеїн розглядається як маркер ушкодження сітківки і потенціальна мішень для терапії ДР[9]

Гіпергомоцистеїнемія часто пов'язана з віковими та фізіологічними особливостями, а також індивідуальними генетичними, епігенетичними, харчовими факторами ризику. Однак провідна причина накопичення гомоцистеїну полягає в недостатній кількості та/або дисфункції ферментів і кофакторів (водорозчинних вітамінів B2, B6, B9 і B12), пов'язаних з метаболізмом гомоцистеїну, особливо у людей похилого віку[7, 8]. Саме тому, активно вивчається асоціація поліморфізмів основних генів, які кодують синтез ферментів фолатного циклу MTHFR (англ., functional methylenetetrahydrofolate reductase) C677T, MTHFR A1298C, MTR (англ., methionine synthase) A2756G, як потенційних тригерних механізмів гіпергомоцистеїнемії. Описані порушення нервової системи, в тому числі стан нейрозапалення мозкової тканини, що призводить до розвитку хвороби Альцгеймера, Паркінсона і аутизму у дітей, в основі яких лежить генетично детермінований дефіцит ферментів фолатного циклу, визначений поліморфізмами генів. [10, 11].

Водночас, немає єдиної думки щодо наявності асоціації поліморфізмів вказаних генів із розвитком ДР на тлі ЦД2. Є дані про зв'язок гену поліморфізму гена MTHFR (677C/T) і розвитком ДР, але на популяції азійських пацієнтів [12-14]. І також є спірним питання чи пов'язані ці поліморфізми із розвитком ЦД2 та його ускладнень [8, 15, 16].

Мета роботи – вивчення ролі поліморфізмів ферментів фолатного циклу MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G у прогресуванні діабетичної ретинопатії у пацієнтів на цукровий діабет 2 типу

Матеріал та методи

Дослідження включало 83 хворих (83 ока) із ЦД2, у яких за результатами офтальмологічного обстеження виявлено різні стадії ДР. Усім хворим були виконані загальноприйняті офтальмологічні обстеження: візометрія, рефрактометрія, статична периметрія Humphrey, тонометрія, біомікроскопія, за необхідністю – гоніоскопія, офтальмоскопія лінзою Goldman, оптична когерентна томографія на OCTDRI Triton (Торсон, Японія) у режимі macula. Обстеження сітківки проводились фундус-камерою з фотографуванням очного дна у 7 перехресних полях згідно з протоколом Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). Флюоресцентну ангіографію виконували за показаннями.

Стадії ДР визначали за шкалою ETDRS, що надало нам змогу визначити дві дослідні групи (ДГ) спостереження, які відрізнялися ступенем ушкодження: НПДР група (43 хворих, 43 ока) до якої включили пацієнтів із початковою, помірною та тяжкою непроліферативною ДР, ПДР група (40 хворих, 40 очей), яку склали пацієнти із початковою, помірною, тяжкою та прогресуючою проліферативною ДР. У всіх пацієнтів досліджувався рівень гормонів щитоподібної залози для виключення наявності гормональних порушень. Контрольну групу (КГ) 35 осіб без ЦД становили пацієнти, які не мали діагностованих порушень метаболізму і звернулися з метою профілактичного огляду в клініко-діагностичну лабораторію Університетської клініки НМУ імені О.О. Богомольця. Молекулярно-генетичні дослідження виконували в лабораторії Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О. О. Богомольця за стандартними методиками. Вміст L-гомоцистеїну визначали в плазмі крові методом твердофазного імуно-ферментного аналізу (ІФА) на напівавтоматичному аналізаторі RT2100C (RAYTO) (Китай) із використанням інкубатора-шейкера для мікропланшетів PST-60HL-4 (BioSun) (Латвія) та автоматичного планшетного промивача - вошеру Bio-Rad PW40 за допомогою набору Axis-Shield (FHCY100, Lot 902943161) (Великобританія). Для дослідження була використана венозна кров. Забір проводили в умовах маніпуляційного кабінету у пробірки із фіолетовою кришкою об'ємом 4 мл, що містили (EDTA, K3) як антикоагулянт. Після центрифугування, плазму відбирали в окрему пробірку типу Епендорф для дослідження ІФА, а осад (шар із клітинами) використовували для генетичних досліджень. Матеріал зберігали при температурі -20 °C.

Для виділення геномної ДНК використовували набори PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA, виробник INVITROGEN (США). На першому етапі проводили інкубацію аліквоти клітинного осаду із Proteinase K, RNase A та Digestion Buffer при 55°C протягом 10 хв для приготування лізату клітин та руйнування РНК. Всі етапи зв'язування ДНК з мембраною колонки, очистки та елюцію проводили шляхом центрифугування. Аналіз поліморфних ДНК-локусів проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу з використанням системи TaqMan® SNP Genotyping Assay (США) на ампліфікаційній системі Applied Biosystems 7500 RealTime PCR System (США). Досліджували поліморфізми наступної локалізації: MTHFR C677T (rs 1801133); MTHFR A1298C (rs 1801131); MTR A2756G (rs 1805087)

Для підвищення вірогідності отриманих результатів оцінки асоціацій між досліджуваними показниками КГ та ДГ, здійснювали розрахунок показників співвідношення шансів (odds ratio, OR) зі стандартною похибкою відношення шансів (S) і пов'язаного з ним 95%

довірчого інтервалу (95% confidence interval, 95% CI). Значення показника OR розраховували за формулою:

$$OR = \frac{A \cdot D}{B \cdot C}$$

де А – кількість випадків, коли є і фактор ризику, і наслідок, В – кількість випадків, коли є фактор ризику, однак немає наслідку, С – кількість випадків, коли немає фактору ризику, однак є наслідок, а D – кількість випадків, коли немає ні фактору ризику, ні наслідку. Враховували, що значення OR, яке перевищує 1, означає, що шанси виявити фактор ризику більше у групі з наявністю результату. Це означає, що в такому випадку фактор має прямий зв'язок із ймовірністю настання результату. Отже, значення OR показує, у скільки разів шанси певного результату в ДГ вищі, ніж у КГ. Для розрахунків у ході проведення статистичного аналізу використовували он-лайн калькулятор (<https://mathcracker.com/>) підрахунку ВІІ та програму Microsoft Excel.

Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету IBM SPSS Statistics 23 та програми MedStat. Перевірку розподілу кількісних показників по всій вибірці даних на відповідність закону Гауса проводили за допомогою одновибірочного критерію Шапіро-Уїлка. Більшість параметрів не відображали нормальний розподіл, тому використовували непараметричні критерії. Дані у групах порівнювали за допомогою рангового однофакторного аналізу за критерієм Крускала-Уолліса, для попарного порівняння використовували критерій Данна або Манна-Уїтні з урахуванням поправки Бонфероні. Відмінності у групах вказували у вигляді р із зазначенням рівня значущості. Вважали, що дані відрізняються за $p < 0,05$. Для опису даних у групах наводили значення медіани (Me) та процентилей 25-й (P25) та 75-й (P75), які визначали в таблицях [QI÷QIII]. Для інтервальної оцінки медіани розраховували 95% довірчий інтервал. Діаграми надавали у вигляді стовпчиків із указанням довірчого інтервалу (ДІ 95%). Якщо наводили дані, що відповідають нормальному розподі-

лу, використовували середнє значення, стандартну похибку або показник дисперсії.

Результати

Для визначення ролі поліморфізмів генів фолатного циклу у розвитку діабетичної ретинопатії на тлі ЦД2 ми провели аналіз розподілу частоти зустрічаємості алелей і генотипів генів rs1801133, rs1805087, rs1801131 в дослідних групах із визначенням показника співвідношення шансів. Дані щодо гену rs1801133 наведені в рис.1 та таблиці 1.

Виявлено, що в КГ переважають особи із поліморфізмом гену і наявністю гетерогенного генотипу СТ (58%), доля носіїв генотипу CC складає 25%, а ТТ – 17%. Серед контингенту пацієнтів зберігається перевага носіїв генотипу СТ (49%), але їх частина зменшена відносно КГ за рахунок збільшення осіб із генотипом CC (45%), і суттєво зменшена доля носіїв генотипу ТТ – 6%. Отже, наявність захворювання більше асоційована із генотипом CC гену rs1801133 і в меншому ступені із генотипом ТТ. Для визначення оцінки асоціацій між досліджуваними показниками провели розрахунок співвідношення шансів (odds ratio, OR) зі стандартною похибкою відношення шансів (S) і пов'язаного з ним 95% довірчого інтервалу (ДІ) (табл. 1).

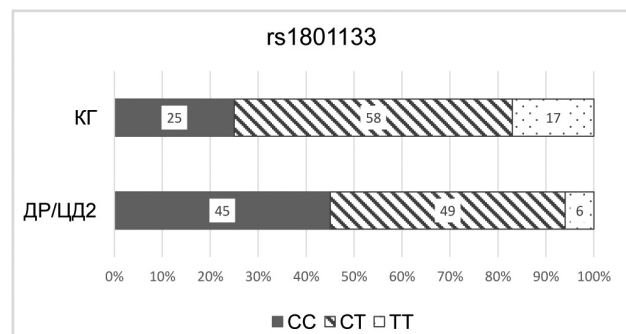


Рис. 1. Аналіз розподілу (%) частоти зустрічаємості алелей і генотипів генів rs1801133 у пацієнтів з діабетичною ретинопатією (ДР) та осіб контрольної групи (КГ).

Таблиця 1. Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів гену rs1801133 в групі пацієнтів ДР/ЦД2 та осіб контрольної групи, через визначення відношення шансів (OR) та довірчий інтервал (ДІ)

rs1801133

Генотип	ДР / ЦД2, n=83	%	Контрольна група, n = 35	%	Відношення шансів (OR)	Довірчий інтервал 95%
CC	37	45	9	25	2,32	0,971-5,562
CT	40	49	20	58	0,698	0,315-1,546
TT	6	6	6	17	0,143	0,039-0,522
	83	100	35	100		
С	114	69	38	54	1,846	1,041-3,275
Т	52	31	32	46	0,542	0,305-0,961
	166	100	70	100		

Примітка. ДР – діабетична ретинопатія; ЦД2 – цукровий діабет 2 типу; n – кількість хворих.

Ми виявили, що OR для СС складає 2,32 (95% ДІ 0,971-5,562; $p > 0,05$) для СТ 0,698 (95% ДІ 0,315-1,546; $p > 0,05$), для ТТ 0,143 (95% ДІ 0,039-0,522; $p > 0,05$). Для пацієнтів є притаманним наявність алеля С (69%), який зустрічається у 2 рази частіше, ніж Т. А у осіб КГ алелі С та Т зустрічаються в рівному ступені (54% та 46%), із незначною перевагою С. При цьому OR для С складає 1,846 (95% ДІ 1,041-3,275; $p > 0,05$), а для Т складає 0,542 (95% ДІ 0,305-0,961; $p > 0,05$). Отже, не виявлено доказів асоціації поліморфізмів гену rs1801133 із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету.

За результатами аналізу асоціації поліморфізмів rs1805087 із розвитком ДР, виявлено (рис.2, табл. 2), що у осіб КГ зустрічався лише мажорний генотип АА у 70%, та у 30% гетерогенний генотип АГ.

Для пацієнтів також було притаманне переважання генотипу АА (60%), 35% осіб спостерігали генотип АГ, але у 5% хворих на ДР був виявлений генотип GG.

У порівнянні частоти зустрічаємості поліморфізмів у пацієнтів та осіб КГ OR для АА складає 0,606 (95% ДІ 0,258-1,425; $p > 0,05$), для АГ 1,343 (95% ДІ

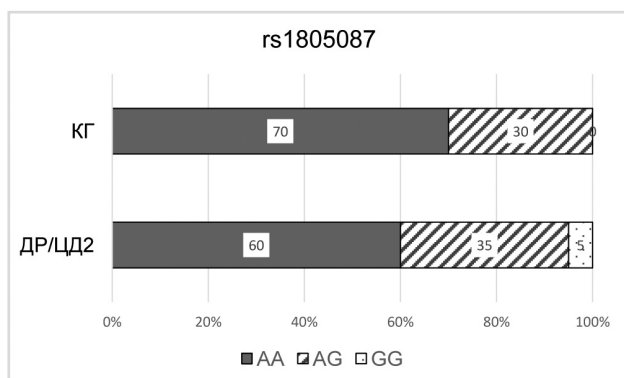


Рис. 2. Аналіз розподілу (%) частоти зустрічаємості алелів і генотипів генів rs1805087 у пацієнтів з діабетичною ретинопатією (ДР/ЦД2) та осіб контрольної групи (КГ).

0,568-3,176; $p > 0,05$). В обох групах переважають особи із алелем А. В групі пацієнтів алель А зустрічається практично в 3,5 рази частіше, ніж алель G, а в групі контролю алель А зустрічається частіше в 5,6 разів. OR для А складає 0,581 (95% ДІ 0,271-1,246; $p > 0,05$), а для G 1,721 (95% ДІ 0,803-3,69; $p > 0,05$). Таким чином, немає доказів асоціації гену rs1805087 із розвитком ДР на тлі ЦД2.

Аналіз асоціації поліморфізмів гену rs1801131 наведений у рис. 3, та табл. 3. Виявлено, що у 50% осіб КГ переважним є генотип АС. Генотип АА зустрічався у 45% осіб, а генотип СС у 5%. Розподіл частоти зустрічаємості цих генотипів у пацієнтів ДГ був схожий, і переважали особи із генотипом АС (53%). Генотип АА спостерігали у 34% хворих на ДР, і 13% мали генотип СС.

Отже, OR для АА складає 0,605 (95% ДІ 0,27-1,353; $p > 0,05$), для АС OR складає 1,195 (95% ДІ 0,542-2,634; $p > 0,05$), для СС – 2,521 (95% ДІ 0,529-12,02; $p > 0,05$). В обох групах переважає алель А, у КГ зустрічається в 1,5 рази частіше, в групі пацієнтів в 2,3 рази. OR для А складає 0,667 (95% ДІ 0,37-1,203; $p > 0,05$), а для С – 1,5 (95% ДІ 0,832-2,706; $p > 0,05$).

Таким чином, за результатами наших спостережень, не виявлений зв'язок поліморфізмів основних генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що кодують ферменти фолатного циклу із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету.

Враховуючи потенційний вплив високої концентрації L-гомоцистеїну на розвиток судинних дисфункцій, властивості та стан ендотелію, і, відповідно, розвиток мікросудинних ускладнень, в тому числі і на тлі гіперглікемії, ми визначали рівень речовини в сироватці крові пацієнтів з ДР/ЦД2 та осіб КГ, який порівнювали за значенням медіани (Me; [QI-QIII]). Виявили, що рівень L-гомоцистеїну у крові пацієнтів був в 2 рази вище ($p < 0,05$) і складав 21,12 [15,41 – 24,57] мкмоль/л, порівняно із КГ – 11,85 [10,63 – 16,96] мкмоль/л. В розрізі груп порівняння пацієнтів з НПДР і ПДР різ-

Таблиця 2. Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів гену rs1805087 в групі пацієнтів ДР/ЦД2 та осіб контрольної групи, через визначення відношення шансів (OR) та довірчий інтервал (ДІ)

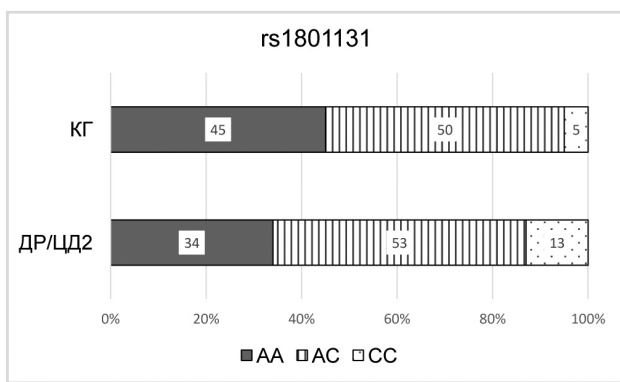
rs1805087						
Генотип	ДР / ЦД2, n=83	%	Контрольна група, n=35	%	Відношення шансів (OR)	Довірчий інтервал 95%
АА	50	60	25	70	0,606	0,258-1,425
АГ	29	35	10	30	1,343	0,568-3,176
GG	4	5	0	0		
	83	100	35	100		
А	129	78	60	85	0,581	0,271-1,246
G	37	22	10	15	1,721	0,803-3,69
	166	100	70	100		

Примітка. ДР – діабетична ретинопатія; ЦД2 – цукровий діабет 2 типу; n – кількість хворих.

Таблиця 3. Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів гену rs1801131 в групі пацієнтів ДР/ЦД2 та осіб контрольної групи, через визначення OR та довірчий інтервал

rs1801131						
Генотип	ДР / ЦД2, n=83	%	Контрольна група, n=35	%	Відношення шансів (OR)	Довірчий інтервал 95%
AA	28	34	16	45	0,605	0,27-1,353
AC	44	53	17	50	1,195	0,542-2,634
CC	11	13	2	5	2,521	0,529-12,02
	83	100	35	100		
A	100	60	50	70	0,667	0,37-1,203
C	66	40	22	30	1,5	0,832-2,706
	166	100	72	100		

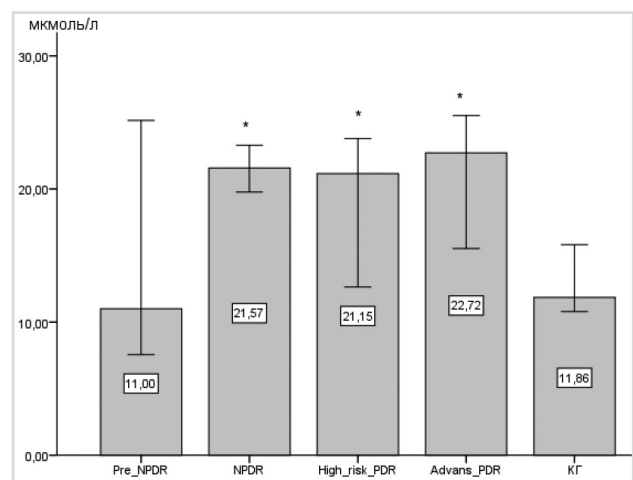
Примітка. ДР – діабетична ретинопатія; ЦД2 – цукровий діабет 2 типу; n – кількість хворих.

**Рис. 3.** Аналіз розподілу (%) частоти зустрічаємості алелей і генотипів генів rs1801131 у пацієнтів з діабетичною ретинопатією (ДР) та осіб контрольної групи (КГ).

ниці показника L-гомоцистеїну практично не було. У хворих із НПДР його рівень складав 20,86 мкмоль/л [15,09-25,15], а у пацієнтів із ПДР – 21,68 мкмоль/л [16,02 – 23,76]. Однак ми у вказаних групах визначили підгрупи пацієнтів відповідно до стадії ретинопатії і порівняли показник L-гомоцистеїну із інтенсивністю ушкодження сітківки на тлі ЦД2 (рис. 4) у групах: Pre_NPDR (дуже м'яка НПДР) (n=12), NPDR (помірно важка НПДР) (n=21), High_risk_PDR (Високого ризику ПДР) (n=20) та Advans_PDR (Розвинена ПДР) (n=20).

Виявили, що під час розвитку ДР рівень L-гомоцистеїну підвищується вже на початку захворювання і розвитку НПДР. В групі із Pre_NPDR медіана вмісту речовини складала Me; [QI÷QIII] (Min-Max) 11,0 мкмоль/л [9,11÷19,27] (7,56 – 25,15), що у порівнянні із значенням КГ – 11,85 мкмоль/л [10,6÷16,9] (6,57 – 25,89) відображає суттєву варіацію даних в ДГ пацієнтів. Поглиблення ретинопатії із дуже м'якої до помірно важкої НПДР супроводжувалося збільшенням речовини практично вдвічі.

Отже, не зважаючи на те, що ми не виявили асоціації генетично детермінованого дефіциту ферментів фолатного циклу із ризиком розвитку ДР на тлі ЦД, рі-

**Рис. 4.** Рівень L-гомоцистеїну (мкмоль/л) в сироватці крові пацієнтів із різною стадією діабетичної ретинопатії (ДР) та осіб контрольної групи (КГ), за значенням медіани та довірчий інтервал 95%. * – відмінність від контрольної групи (p<0,05).

вень L-гомоцистеїну можна вважати доволі суттєвим маркером розвитку мікросудинних ускладнень ЦД2, зокрема ДР. Тому, ми вважаємо актуальним подальший пошук факторів, які стають тригерними, для структурного ушкодження сітківки і поглиблення стадії ретинопатії у пацієнтів із ЦД2.

Аналіз рівня L-гомоцистеїну у пацієнтів ДР/ЦД2 в залежності від генетично детермінованих поліморфізмів генів rs1801133, rs1805087, rs1801131 наведений на рис. 5, де ми порівнювали вміст речовини у сироватці пацієнтів з НПДР та ПДР. У всіх носіїв різних поліморфізмів гену rs1801133 рівень L-гомоцистеїну відображав загальну картину підвищення його у пацієнтів в 2 рази (p<0,05) і рівень L-гомоцистеїну практично не відрізнявся в залежності від ступеня ушкодження сітківки. Для носіїв найбільш розповсюджених варіантів гену rs1805087 AA і AG також зберігалася залежність, яка була притаманна усій групі, що досліджувалася

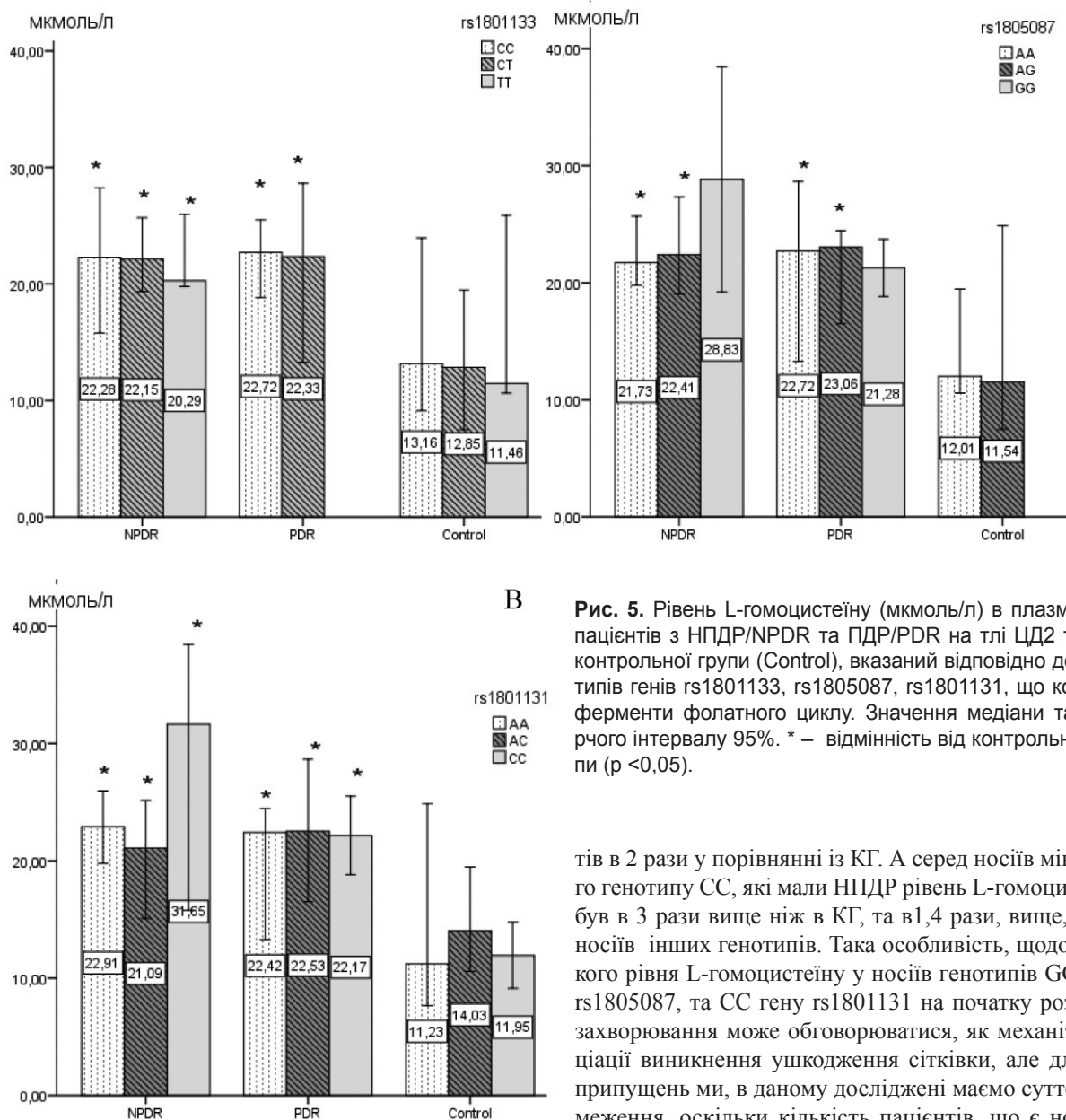


Рис. 5. Рівень L-гомоцистеїну (мкмоль/л) в плазмі крові пацієнтів з НПДР/НПДР та ПДР/ПДР на тлі ЦД2 та осіб контрольної групи (Control), вказаний відповідно до генотипів генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що кодують ферменти фолатного циклу. Значення медіани та довірчого інтервалу 95%. * – відмінність від контрольної групи ($p < 0,05$).

– у пацієнтів із НПДР та ПДР рівень L-гомоцистеїну перевищував в 2 рази ($p < 0,05$) показник контролю і між групами хворих не відрізнявся. Однак, у носіїв мінорного генотипу GG ми виявили цікаву особливість: на стадії захворювання НПДР рівень L-гомоцистеїну був в 1,3 рази вище, ніж у носіїв інших генотипів, і відповідно в 2,4 рази вище, ніж середній в контролі, однак у носіїв цього генотипу хворих на ПДР, рівень L-гомоцистеїну достовірно не відрізнявся від аналогічних показників у групі. Враховуючи, що GG генотип у осіб КГ ми не виявили, можна думати, що цей генотип може бути претендентом на тригерні чинники розвитку ДР на тлі ЦД2.

Аналогічна картина спостерігалася і серед носіїв поліморфізмів гену rs1801131. Серед носіїв найбільш розповсюджених генотипів AA і AC зберігалася залежність підвищення рівню L-гомоцистеїну у пацієнтів

в 2 рази у порівнянні із КГ. А серед носіїв мінорного генотипу CC, які мали НПДР рівень L-гомоцистеїну був в 3 рази вище ніж в КГ, та в 1,4 рази, вище, ніж у носіїв інших генотипів. Така особливість, щодо високого рівня L-гомоцистеїну у носіїв генотипів GG гену rs1805087, та CC гену rs1801131 на початку розвитку захворювання може обговорюватися, як механізм ініціації виникнення ушкодження сітківки, але для цих припущень ми, в даному дослідженні маємо суттєві обмеження, оскільки кількість пацієнтів, що є носіями цих генотипів доволі мала і не дає підставу стверджувати про наші знахідки, як закономірність, і потребують подальших досліджень і спостережень.

Для подальшого пошуку чинників поглиблення ДР на тлі ЦД2 ми аналізували залежність тривалості діабету у пацієнтів різних груп та із різними варіантами генетично детермінованого дефіциту фолатного циклу (рис. 6). В групі НПДР середня тривалість основного захворювання була ($M \pm SD$) $13,6 \pm 6,51$ років, а в групі ПДР складала $16,8 \pm 6,47$ років і достовірно не відрізнялася між групами.

Відсутність достовірної різниці між групами НПДР та ПДР щодо середньої тривалості діабету та поглибленням ретинопатії в даному дослідженні дає підставу шукати інші механізми, які призводять до підвищення ступеню ушкодження сітківки. Отже, більш детальний аналіз залежності тривалості ЦД2 та генетичного дефіциту фолатного циклу показав, що у носіїв найбільш

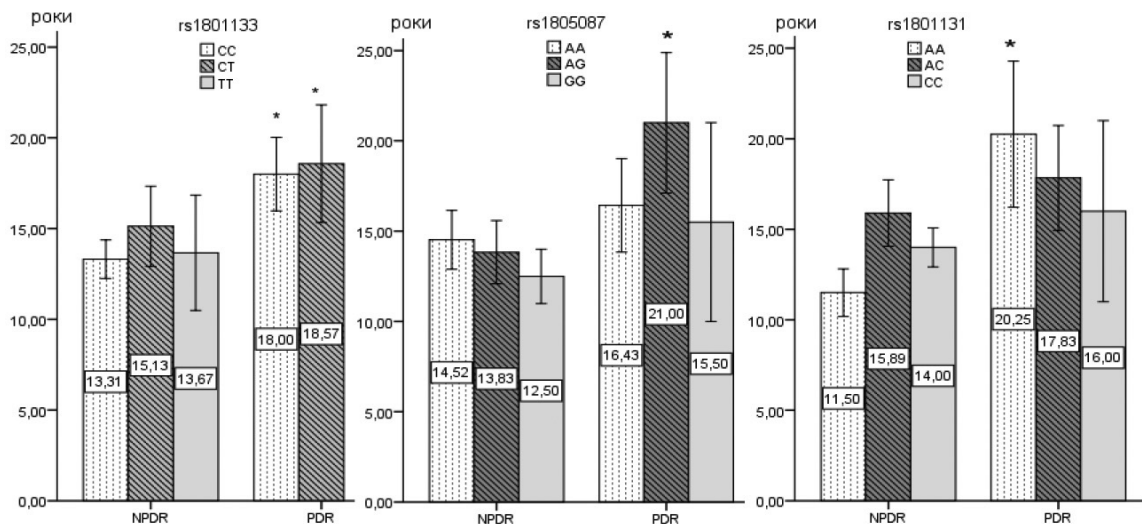


Рис. 6. Середня тривалість ЦД2 (роки) у хворих на НПДР/НПДР та ПДР/ПДР в залежності від генотипу генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що кодують ферменти фолатного циклу. Відображено середні значення \pm SD. * – відмінність із аналогічним показником між групами (p < 0,05).

розповсюджених генотипів CC та CT (а вірогідно алелі C) гену rs1801133 тривалість ЦД2 є важливим фактором прогресування ретинопатії, оскільки середня тривалість діабету достовірно розрізнялася у хворих із НПДР та ПДР. Також тривалість ЦД2 впливала на прогресування ретинопатії у пацієнтів із генотипом AG гену rs1805087 в 1,5 рази і генотипом AA гену rs1801131 – в 1,7 разів (p < 0,05), яке спостерігалось на тлі більшої тривалості ЦД2. У носіїв інших генотипів генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що визначають дефіцит ферментів фолатного циклу відмічалася тенденція поглиблення ретинопатії із збільшенням тривалості ЦД2, але цей фактор не був провідним у патогенезі прогресування ускладнення.

Отже, аналіз розподілу генотипів та алелей основних генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що кодують ферменти фолатного циклу в наших групах пацієнтів на ДР/ЦД2 показав, що для гену MTHFR (677C/T, rs1801133) мажорним є гетерозиготний поліморфізм CT, який визначається в контролі у 58% осіб. Розвиток ДР супроводжувався іншим співвідношенням: в контингенті пацієнтів спостерігали зменшення частки носіїв CT і збільшення осіб із генотипом CC. Частка осіб із генотипом CC в КГ була в 1,8 разів менше ніж серед пацієнтів. Можна припустити, що наявність генотипу CT є фактором утримання розвитку ЦД2. Також ми показали, що у носіїв найбільш розповсюджених генотипів CC та CT (а вірогідно алелі C) гену rs1801133 більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2.

Обговорення

Аналіз розподілу генотипів та алелей основних генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що кодують ферменти фолатного циклу в наших групах пацієнтів

на ДР/ЦД2 показав, що для гену MTHFR (677C/T, rs1801133) мажорним є гетерозиготний поліморфізм CT, який визначається в контролі у 58% осіб, що вірогідно є фактором утримання розвитку ЦД2, тому що розвиток ДР за нашими даними супроводжувався зменшенням в групі пацієнтів носіїв CT за рахунок збільшення осіб із генотипом CC, яких в контролі було в 1,8 разів менше. Також ми показали, що у носіїв найбільш розповсюджених генотипів CC та CT (а вірогідно алелі C) гену rs1801133 більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2.

Для обговорення ми наводимо результати, щодо гену MTHFR (677C/T). В роботі Raza [15] із залученням 175 осіб населення Північної Індії, у тому числі 87 хворих на ЦД2 та 88 осіб контролю, не виявлено зв'язку гена MTHFR з випадками ЦД2, оскільки отримані частоти генотипу CC, CT, TT становили 40%, 43% і 17% у випадках цукрового діабету 2 типу і 56%, 29% і 15% у здорових осіб контролю відповідно. OR для CC становило 0,54 (95% ДІ 0,29-0,98, P=0,041), для CT 1,76 (95% ДІ 0,94-3,30, P=0,07), і для TT – 1,2 (95% ДІ 0,53-2,70, P=0,66). Автори пропонують продовжити подальше дослідження з більшими групами, але вважають рекомендувати CC генотип розглядати у якості маркером для раннього виявлення групи ризику ЦД2 [15].

Дослідження Niu W. та Qi Y. [12], що вивчали зв'язок поліморфізму цього гена з ДР шляхом проведення мета-аналізу, який підсумовував загалом дані 1599 осіб, що були наведені у 8 дослідженнях присвячених діабетичній ретинопатії, демонструють, що генотип гена MTHFR 677TT може надавати помірно підвищений ризик діабетичної ретинопатії в західних азіатів та африканців. Носійство генотипу 677TT за показником (відношення шансів [OR] встановило в

1,86 (95% ДІ: 1,21–2,86; $P = 0,004$) рази більше шансів у пацієнтів з ЦД2 на розвиток ретинопатії, ніж відсутності цього ускладнення [12]. Аналогічна думка і у дослідників із Китаю [13].

За нашими спостереженнями, частка носіїв генотипу ТТ в КГ була більше в 2,8 разів, ніж серед пацієнтів, і шанс розвитку ДР у них був невисоким. Але, ми зауважували на те, що наші дані мають суттєві обмеження, щоб висловлюватися про популяційне носійство генотипів, які асоційовані із розвитком ДР, через дуже малу кількість спостережень.

Аналіз генотипів гену MTR 2756A/G (rs 1805087) показав, що мажорним є гомозиготний генотип АА, який зустрічався у 70% осіб КГ та 60% пацієнтів. У носіїв генотипу АГ провідним фактором прогресування ДР була тривалість ЦД2. Гомозиготний генотип GG у осіб КГ взагалі не був виявлений і зустрічався лише у пацієнтів, що можна вважати фактором ризику розвитку ДР. Саме із цим генотипом ми зв'язали неочікувану знахідку – достовірне підвищення в 1,3 рази L-гомоцистеїну на стадії НПДР у порівнянні із носіями інших генотипів, що відносно рівню у контрольній групі було вище в 2,4 рази.

Аналіз гену MTHFR 1298 A/C (rs1801131) показав, що половині усіх досліджених осіб (КГ та пацієнтів), був притаманний гетерозиготний генотип АС, який не був пов'язаний із розвитком захворювання. Для носіїв гомозиготного генотипу АА важливим фактором прогресування ДР виявили тривалість ЦД2. Мінорний генотип СС був в 2,6 рази більше поширений у пацієнтів дослідних груп, ніж в контрольній групі і з ним також було асоційоване на стадії НПДР підвищення в 1,4 рази рівню L-гомоцистеїну у порівнянні із носіями інших генотипів, і гіпергомоцистеїнемія в 3 рази вища ніж в контрольній групі.

Висновки

1. Не виявлений зв'язок поліморфізмів основних генів rs1801133, rs1805087, rs1801131, що кодують ферменти фолатного циклу із розвитком ДР на тлі ЦД2 у порівнянні із особами без діабету.

2. У носіїв мінорних гомозиготних генотипів: GG гену MTR 2756A/G і генотипу СС гену MTHFR 1298 A/C виявлене суттєве підвищення рівня гомоцистеїну в крові на початку розвитку ДР, що потребує подальшого з'ясування ролі гіпергомоцистеїнемії як чинника прогресування ускладнення, або маркера ступеню ушкодження тканин.

3. У носіїв найбільш розповсюджених генотипів СС та СТ гену rs1801133 генотипу АГ гену rs1805087, і генотипу АА гену rs1801131 більш важливим фактором прогресування ретинопатії є тривалість ЦД2.

Література

- Barrett E.J., Liu Z., Khamaisi M. et al. Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2017, 102(12), 4343–4410.

- Shi C., Wang P., Airen S. et al. Nutritional and medical food therapies for diabetic retinopathy. Eye and vision (London, England), 2020, 7, 33.
- Natrus L.V. A novel concept of differences in pathogenetic mechanism of diabetic retinopathy progression between type 2 diabetes mellitus patients differing in the PPAR γ genotype. J. ophthalmol. (Ukraine). 2020; 5:36–42.
- Kowluru R.A. Diabetic Retinopathy: Mitochondria Caught in a Muddle of Homocysteine. Journal of clinical medicine, 2020, 9(9), 3019.
- Kowluru R.A., Mohammad G., Sahajpal N. Faulty homocysteine recycling in diabetic retinopathy. Eye and vision (London, England), 2020, 7, 4.
- Malaguarnera G., Gagliano C., Giordano M. et al. Homocysteine serum levels in diabetic patients with non proliferative, proliferative and without retinopathy. Biomed Res Int. 2014; 2014:191497.
- Koklesova L., Mazurakova A., Samec M. et al. Homocysteine metabolism as the target for predictive medical approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. The EPMA journal, 2021, 12(4), 1–29. Advance online publication.
- Raghubeer S., & Matsha T.E. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. Nutrients, 2021, 13(12), 4562.
- Tawfik A., Mohamed R., Elsherbiny N. et al. Homocysteine: A Potential Biomarker for Diabetic Retinopathy. Journal of clinical medicine, 2019, 8(1), 121.
- Maltsev D., Natrus L. The Effectiveness of Infliximab in Autism Spectrum Disorders Associated with Folate Cycle Genetic Deficiency. Psychiatry, psychotherapy and clinical psychology, 2020, Vol 11, (3). P 581–592. DOI:10.34883/PI.2020.11.3.015
- Maltsev D. Features of folate cycle disorders in children with ASD. Bangladesh Journal of Medical Science, 2020, 19(4), 737–742.
- Niu W., Qi Y. An updated meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C/T polymorphism with diabetic nephropathy and diabetic retinopathy. Diabetes Res Clin Pract. 2012, 95(1):110–8.
- Xu WH, Zhuang Y, Han X, Yuan ZL. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and diabetic retinopathy risk: a meta-analysis of the Chinese population. J Int Med Res. 2020; 48(1):300060518816834.
- Luo S, Wang F, Shi C, Wu Z. A Meta-Analysis of Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene (MTHFR) 677C/T Polymorphism and Diabetic Retinopathy. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2016; 13(8):806.
- Raza ST, Abbas S, Ahmed F, Fatima J, Zaidi ZH, Mahdi F. Association of MTHFR and PPAR γ 2 gene polymorphisms in relation to type 2 diabetes mellitus cases among north Indian population. Gene. 2012, 15; 511(2):375–9.
- Zhong JH, Rodríguez AC, Yang NN, Li LQ. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and risk of type 2 diabetes mellitus. PLoS One. 2013 Sep 4; 8(9):e74521.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Натрус Лариса Валентинівна - lnatrus777@gmail.com

Внесок авторів. Всі автори відповідають критеріям авторства, засвідчують, що кожен автор брав

значну участь у написанні роботи, включаючи участь в опрацюванні концепції, проектуванні, аналізу, написання та ревізії статті, та кожен автор відповідає за її зміст.

Декларація про конфлікт інтересів. Всі автори не мають жодного реального чи потенційного конфлікту інтересів (фінансові, персональні, професійні та інші інтереси), які б могли вплинути на предмет чи матеріал, описаний та обговорений в даному рукописі.

Джерела підтримки. Зовнішні джерела фінансування відсутні.

Учасники дослідження. Всі учасники дали інформовану згоду на участь в дослідженні. Дослідження проведені з дотриманням вимог Гельсінської декларації, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (1977 р.), відповідного положення ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.) та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Надійшла 07.07.2022