

## Вопросы клинической офтальмологии

УДК 617.735–02:616.379–008.64]-056.7

### Зв'язок поліморфізмів rs759853 ТА rs9640883 гена AKR1B1 з розвитком діабетичної ретинопатії

С. Ю. Могілевський<sup>1</sup>, д-р мед. наук, проф., О. В. Бушуєва<sup>2</sup>, асистент, С. В. Зяблицев<sup>3</sup>, д-р мед. наук, проф., Л. В. Натрус<sup>3</sup>, д-р мед. наук, проф.

<sup>1</sup> Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика; Київ (Україна)

<sup>2</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; Львів (Україна)

<sup>3</sup> Національний медичний університет імені О. О. Богомольця; Київ (Україна)

E-mail: sergey.mogilevsky@gmail.com

**Актуальність.** Гіперглікемія за умов цукрового діабету 2 типу (ЦД2Т) активує поліоловий шлях метаболізму глюкози, внаслідок чого у клітинах накопичуються сорбітол та фруктоза. Ключовий фермент поліолового шляху — альдозоредуктаза, поліморфізм гену якої (AKR1B1) впливає на його активність та може мати асоціацію з розвитком діабетичної ретинопатії (ДР). Отже **метою дослідження** було встановлення наявності асоціації з ДР та оцінка конкретного впливу генетичних поліморфізмів, які впливають на активність альдозоредуктази (rs759853 і rs9640883).

**Матеріал та методи.** До дослідження залучено 311 осіб, які були розподілені на чотири групи: I групу склали 107 офтальмологічно здорових добровольців (контроль); в II групу (n=76) увійшли пацієнти з ЦД2Т без змін на очному дні; III групу (n=64) склали пацієнти з непроліферативною, а IV (n=64) — пацієнти з проліферативною ДР. Аналіз поліморфних ДНК-локусів здійснювали з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США) в автоматичному ампліфікаторі Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США).

**Результати.** Показана наявність для хворих з української популяції асоціації генетичних поліморфізмів гена AKR1B1 з розвитком ДР (мутантна алель А поліморфізму rs759853 та генотип А/А підвищує шанси ДР, відповідно, у 2,8 рази та у 5,2 рази (p<0,001). Визначена наявність впливу поліморфізму rs9640883 на розвиток ДР (p<0,001): предкова алель G підвищує у 2,6 рази, а гомозигота G/G — у 3,0 рази шанси розвитку ДР. Наявність алелей «ризик» негативно впливала й на розвиток ДР у хворих на ЦД2Т, тоді як на розвиток проліферативної стадії ДР ці поліморфізми не впливали. Значення поліморфізму у розвитку ДР було доведено результатами дисперсійного аналізу (для rs759853 — F=18,9; p<0,001 та для rs9640883 — F=6,9; p=0,001).

**Висновки.** Отже, при ДР за умов наростання тяжкості патологічного процесу відмічено зниження частоти предкової алелі G та збільшення частоти мутантної алелі А поліморфізму rs759853 гена AKR1B1. Показно суттєве збільшення частоти предкового генотипу G/G поліморфізму rs9640883 гена AKR1B1 у хворих на ДР на тлі зменшення частоти гетерозиготи G/A та зникнення мінорної гомозиготи А/А.

**Ключові слова:** діабетична ретинопатія, AKR1B1, rs759853, rs9640883

**Актуальність.** На даний час вже не визиває сумніву, що у розвитку діабетичної ретинопатії (ДР) суттєву роль відіграють генетичні чинники [1–4], яким відводять до 50 % ризику її розвитку. Виявлення пацієнтів, схильних до розвитку ДР, сприятиме розробці індивідуального підходу до впровадження профілактичних заходів та лікування. Генетичні чинники можна вважати есенціальними факторами виникнення різних ускладнень цукрового діабету 2 типу (ЦД2Т), а, насамперед, — ДР [5, 6]. Показа-

на наявність спадковості при розвитку ДР в різних популяціях, що реалізується незалежно від рівня гіперглікемії та супутніх факторів ризику навколишнього середовища [7, 8].

Механізм розвитку ДР багатокомпонентний і включає комплексне порушення вуглеводного, лі-

підного, білкового та електролітного видів обміну. Гіперглікемія активує поліоловий шлях метаболізму глюкози, внаслідок чого накопичуються сорбітол та фруктоза. Перетворення глюкози на сорбітол не перевищує 1 % за відсутності гіперглікемії, але у пацієнтів з ЦД2Т цей відсоток збільшується до 7–8 % [5]. Ключовий фермент поліолового шляху — альдозоредуктаза, який перетворює глюкозу на сорбітол. Саме з цього ферменту починаються порушення внутрішньоклітинного гомеостазу, оскільки кінцеві продукти метаболізму глюкози за сорбітоловим шляхом, сорбітол та фруктоза, майже не проникають через клітинну мембрану та накопичуються в клітинах [8]. Отже дослідження наявності асоціації із захворюванням та оцінка конкретного впливу генетичних поліморфізмів, які впливають на активність гену альдозоредуктази (rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1), в українській популяції є дуже актуальним та сучасним.

**Мета дослідження.** Встановити асоціацію генотипу поліморфізмів rs759853 та rs9640883 гена AKR1B1 з розвитком ДР у хворих української популяції.

### Матеріал та методи

Дане дослідження проведено на базі кафедри офтальмології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. I групу (контрольну) склали 107 офтальмологічно здорових добровольців відповідного до інших груп віку та статі, які не мали ЦД та інших системних захворювань. II групу склали 76 пацієнтів з ЦД2Т без змін на очному дні; III групу склали 64 пацієнти з встановленим діагнозом непроліферативної ДР (ДНПР) і IV групу склали 64 пацієнти з встановленою проліферативною ДР (ДПР). Всі пацієнти II–IV груп були прооперовані з приводу катаракти. Загалом до даного дослідження було залучено 311 осіб. Офтальмологічні дослідження включали візометрію, тонометрію за Гольдманом, статичну периметрію на периметрі Humphrey, Carl Zeiss (Німеччина), біомікроскопію на щільній лампі Haag-Streit BQ 900, (Швейцарія), гоніоскопію, офтальмоскопію за допомогою контактних та безкон-

тактних лінз (Volk Optical, USA), фотографування очного дна в 7 ділянках згідно протоколів дослідження ETDRS та флюоресцентну ангіографію на фундус камері Topcon TRC NW7 SF (Японія), спектральну оптичну когерентну томографію на Optovue RTVue, Optovue, (США). Аналіз поліморфних ДНК-локусів здійснювали з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США) в автоматичному ампліфікаторі Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, 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 інтроні гена AKR1B1 (за NM\_001628.2: с.-144 C>T. 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/node/506>). Поліморфізм rs9640883 гена AKR1B1 має локалізацію Chr. Chr.7:134116633 за NCBI Build 37. Цей поліморфізм представляє собою просту нуклеотидну заміну G на A у інтроні гена AKR1B1 (за XR\_928003.1: п.94+433 C>T). 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/node/506>). Статистичний аналіз результатів клінічних 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 їх обговорення

На першому етапі дослідження було вивчено вплив поліморфізмів на розвиток ретинопатії у хворих на ЦД2Т. Для цього була проаналізована наявність асоціації генотипів і алелей з ДР (III та IV групи) при порівнянні з контрольною групою (табл. 1).

Як свідчать дані, наведені у таблиці 1, обидва поліморфізми мали чітко виражену асоціацію з розвитком ДР у хворих на ЦД2Т ( $p < 0,001$  у всіх випадках). Гомозиготний генотип за предковою алеллю G/G поліморфізму rs759853 у 2,7 рази знижував шанси розвитку ДР (OR=0,37; 95 % ВІ 0,21–0,64), тоді як гомозиготний генотип за мутантною алеллю A/A

**Таблиця 1.** Значущість відмінностей (за критерієм хі-квадрат) і асоціація (по величині відношення шансів (OR) при вірогідному інтервалі 95 % (ВІ-95 %) генотипів і алелей поліморфізмів гена AKR1B1 у хворих на ЦД2Т з ретинопатією і обстежених контрольної групи

Генотипи Алелі	Групи III і IV	Контроль	OR	ВІ – 95 %	$\chi^2$	P
rs759853						
G/G	32	51	0,37	0,21–0,64	25,98	<0,001
G/A	48	45	0,83	0,49–1,40		
A/A	48	11	5,24	2,55–10,75		
G	82	147	0,35	0,24–0,52	29,31	<0,001
A	70	67	2,82	1,93–4,13		
rs9640883						
G/G	92	49	3,02	1,76–5,20	20,31	<0,001
G/A	36	52	0,41	0,24–0,71		
A/A	0	6	0,06	0,00–1,09		
G	220	150	2,61	1,65–4,12	17,47	<0,001
A	36	64	0,38	0,24–0,61		

збільшував шанси — у 5,2 рази (OR=5,24; 95 % ВІ 2,55–10,75) при порівнянні з контрольною групою. Також і аналіз мультиплікативної моделі спадковості показав наявність достеменно асоціації ДР з алельним поліморфізмом: наявність предкової алелі G у 2,9 рази знижувала (OR=0,35; 95 % ВІ 0,24–0,52), а наявність мутантної алелі A — збільшувала у 2,8 рази шанси виникнення ДР (OR=2,82; 95 % ВІ 1,93–4,13).

Гомозиготний генотип G/G поліморфізму rs9640883 у 3,0 рази збільшував шанси розвитку ДР (OR=3,02; 95 % ВІ 1,76–5,20). Наявність гетерозиготи G/A або гомозиготи за мінорною алеллю A/A цього поліморфізму зменшувала шанси розвитку ДР, відповідно, у 2,4 рази (OR=0,41; 95 % ВІ 0,24–0,71). Аналіз мультиплікативної моделі спадкування показав, що наявність дикої алелі G збільшувала у 2,6 рази шанси розвитку ДР (OR=2,61; 95 % ВІ 1,65–4,12), тоді як наявність у генотипі мінорної алелі A зменшувала шанси розвитку ДР у 2,6 рази (OR=0,38; 95 % ВІ 0,24–0,61).

Надалі були порівняні групи хворих з ЦД2Т без ретинопатії (II група) з об'єднаними даними групи хворих з ЦД2Т та ДР (III та IV групи; табл. 2).

Згідно до отриманих даних, розподіл генотипів вивчених поліморфізмів мав асоціацію з наявністю ретинопатії у хворих на ЦД2Т. Гомозиготні генотипи поліморфізму rs759853 у 2,2 рази (G/G) та у 10,8 рази (A/A) підвищували шанси розвитку ДР ( $p < 0,001$ ; див. табл. 2). Наявність алелі A збільшувала шанси розвитку ДР у хворих на ЦД2Т у 1,5 рази (OR=1,51; 95 % ВІ 1,01–2,25;  $p = 0,047$ ). Очікувано й розподіл генотипів у поліморфізмі rs9640883 мав асоціацію з виникненням ДР ( $p = 0,02$ ).

Отже, наявність алелей «ризик» негативно впливала на розвиток ДР у хворих на ЦД2Т. Алель A поліморфізму rs759853 у 1,5 рази підвищувала шанси розвитку ДР, а у гомозиготному стані (генотип A/A) — ризик збільшувався у 10,8 рази. Ці факти дозволяли припустити можливість прогнозування більшої ймовірності виникнення ЦД2Т за умов наявності алелей «ризик», а в подальшому — більшу прогресію ДР у таких хворих.

З метою визначення ролі вивчених поліморфізмів у виникненні проліферативної форми ретинопатії було проаналізовано порівняння відмінностей розподілу генотипів і алелей за стадіями ДР (табл. 3).

**Таблиця 2.** Значущість відмінностей (за критерієм  $\chi^2$ -квадрат) і асоціація (по величині відношення шансів (OR) при вірогідному інтервалі 95 % (ВІ-95 %) генотипів і алелей поліморфізмів гена AKR1B1 у хворих на ЦД2Т без ДР і за наявності ДР

Генотипи Алелі	ЦД2Т без ретинопатії (II група)	ЦД2Т з ретинопатією (групи III і IV)	OR	ВІ – 95 %	$\chi^2$	P
rs759853						
G/G	10	32	2,20	1,01–4,78	38,87	<0,001
G/A	62	48	0,14	0,07–0,27		
A/A	4	48	10,80	3,71–31,44		
G	82	112	0,66	0,44–0,99	3,98	0,047
A	70	144	1,51	1,01–2,25		
rs9640883						
G/G	48	92	1,49	0,81–2,73	7,46	0,02
G/A	24	36	0,85	0,46–1,57		
A/A	4	0	0,06	0,00–1,18		
G	120	220	1,63	0,96–2,76	3,36	0,07
A	32	36	0,61	0,36–1,04		

**Таблиця 3.** Значущість відмінностей (за критерієм  $\chi^2$ -квадрат) і асоціація (по величині відношення шансів (OR) при вірогідному інтервалі 95 % (ВІ-95 %) генотипів і алелей поліморфізмів гена AKR1B1 у хворих на ДНПР (III група) і ДПР (IV група)

Генотипи Алелі	ДНПР (III група)	ДПР (IV група)	OR	ВІ – 95 %	$\chi^2$	P
rs759853						
G/G	18	14	0,72	0,32–1,60	0,83	0,66
G/A	24	24	1,00	0,49–2,05		
A/A	22	26	1,31	0,64–2,68		
G	60	52	0,78	0,47–1,27	1,02	0,31
A	68	76	1,29	0,79–2,12		
rs9640883						
G/G	48	44	0,73	0,34–1,59	0,62	0,73
G/A	16	20	1,36	0,63–2,96		
A/A	0	0	1,00	0,02–51,17		
G	120	220	0,77	0,38–1,57	0,52	0,47
A	32	36	1,30	0,64–2,63		

В цьому дослідженні групи хворих з ДНПР та ДПР були протиставлені одна одній для з'ясування питання про вплив поліморфізму на розвиток проліферативних змін сітківки при ЦД2Т.

Як свідчать отримані дані, за обома поліморфізмами значущих відмінностей розподілу генотипів та алелей при порівнянні ДНПР та ДПР встановлено не було. Тобто можна зробити висновок, що на розвиток проліферативної стадії ДР поліморфізми rs759853 та rs9640883 гена AKR1B1 не впливали.

Для з'ясування наявності зв'язку поліморфізмів із розподілом пацієнтів по групах був проведений дисперсійний аналіз (табл. 4).

Високі коефіцієнти дисперсій F для обох поліморфізмів AKR1B1 (для rs759853 —  $F=18,9$ ;  $p<0,001$  та для rs9640883 —  $F=6,9$ ;  $p=0,001$ ) доводили значущість генотипу у формуванні груп. Отже можна вважати, що саме наявність того чи іншого генотипу визначала належність пацієнта до відповідної групи, тобто — впливала на стадію патологічного процесу.

Дискримінантний аналіз (табл. 5) показав, що більший внесок у розподіл пацієнтів по групах належить поліморфізму rs759853 ( $F=12,62$ ) у порівнянні з поліморфізмом rs9640883 ( $F=7,00$ ).

### Висновки

1. Виявлена асоціація генетичних поліморфізмів гена AKR1B1 з розвитком ДР (мутантна алель А поліморфізму rs759853 та генотип А/А підвищує шанси ДР, відповідно, у 2,8 рази та у 5,2 рази ( $p<0,001$ ). Наявність алелі G у гетеро- або гомозиготному стані суттєво знижувала шанси розвитку ДР, що, можливо, мало протективний ефект. Також визначена наявність впливу поліморфізму rs9640883 на розви-

**Таблиця 4.** Зв'язок генотипів поліморфізмів гена AKR1B1 з розподілом пацієнтів по групах (дисперсійний аналіз)

Поліморфізм	F	P
rs759853	18,9	<0,001
rs9640883	6,9	0,001

**Таблиця 5.** Вплив генотипів поліморфізмів гена AKR1B1 на формування груп пацієнтів (дискримінантний аналіз)

Поліморфізм	Wilks' — Lambda	F	p
rs759853	0,867	12,62247	<0,0001
rs9640883	0,824	7,00216	<0,0001

ток ДР ( $p<0,001$ ). Наявність предкової алелі G у 2,6 рази, а гомозигота G/G — у 3,0 рази підвищує шанси розвитку ДР. У протипагу цьому, наявність алелі А у 2,6 рази, а гомозиготи А/А — у 16,7 рази знижує шанси розвитку ДР.

3. Наявність алелей «ризик» негативно впливала на розвиток ДР у хворих на ЦД2Т. Алель А поліморфізму rs759853 у 1,5 рази підвищувала шанси розвитку ДР, а у гомозиготному стані (генотип А/А) — ризик збільшувався у 10,8 рази. Також і наявність гомозиготи G/G поліморфізму rs9640883 збільшувала ризик розвитку ДР у хворих на ЦД2Т у 1,5 рази. На розвиток проліферативної стадії ДР поліморфізми rs759853 та rs9640883 гена AKR1B1 не впливали.

3. Дисперсійний аналіз показав високу (для rs759853 —  $F=18,9$ ;  $p<0,001$  та для rs9640883 —  $F=6,9$ ;  $p=0,001$ ) значимість генотипу у формуванні груп. Дискримінантний аналіз показав, що більший внесок у розподіл пацієнтів по групах належить поліморфізму rs759853 ( $F=12,62$ ) у порівнянні з поліморфізмом rs9640883 ( $F=7,00$ ).

### Література

1. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy / S. Abhary, A. W. Hewitt, K. P. Burdon, J. E. Craid // *Diabetes*. — 2009. — Vol. 58, № 9. — P. 2137–2147.
2. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes / R. Sladek, G. Rocheleau, J. Rung [et al.] // *Nature*. — 2007. — Vol. 445. — P. 881–885.
3. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas / D. M. Hallman, J. C. Huber, V. H. Gonzalez [et al.] // *Diabetes Care*. — 2005. — Vol. 28, № 5. — P. 1163–8.
4. Liew G. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy / G. Liew, R. Klein, T. Y Wong // *Int. Ophthalmol. Clin.* — 2009. — Vol. 49, № 2. — P. 35–52.
5. Паньків В. І. Симпозіум № 162 «Цукровий діабет: діагностичні критерії, етіологія і патогенез» / В. І. Паньків // Міжнародний ендокринологічний журнал. — 2013. — № 8. — С. 53–64.
6. Cho H. Genetics of diabetic retinopathy / H. Cho, L. Sobrin // *Curr. Diab. Rep.* — 2014. — Vol. 14, № 8. — P. 515.
7. Heritability of proliferative diabetic retinopathy / K. Hietala, C. Forsblom, P. Summanen, P. H. Groop // *Diabetes*. — 2008. — Vol. 57. — P. 2176–2180.
8. Familial clustering of diabetic retinopathy in Chongqing, China, type 2 diabetic patients / X. Zhang, Y. Gao, Z. Zhou [et al.] // *Eur. J. Ophthalmol.* — 2010. — Vol. 20, № 5. — P. 911–8.
9. Suzen S. Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications / S. Suzen, E. Buyukbingol // *Curr. Med. Chem.* — 2003. — Vol. 10, № 15. — P. 1329–52.

## Связь полиморфизмов rs759853 и rs9640883 гена AKR1B1 с развитием диабетической ретинопатии

С. Ю. Могилевский, О. В. Бушуева, С. В. Зяблицев, Л. В. Натрус,

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика;  
Национальный медицинский университет имени О. О. Богомольца; Киев (Украина);  
Львовский национальный медицинский университет имени Данилы Галицкого Львов (Украина);

**Актуальность.** Гипергликемия при сахарном диабете 2 типа (СД2Т) активирует полиоловый путь метаболизма глюкозы, в результате чего в клетках накапливаются сорбитол и фруктоза. Ключевой фермент полиолового пути — альдозоредуктаза, полиморфизм гена которой (AKR1B1) влияет на его активность и может быть связан с развитием диабетической ретинопатии (ДР). Соответственно, **целью исследования** было установление ассоциации с ДР и оценка конкретного влияния генетических полиморфизмов, определяющих активность альдозоредуктазы (rs759853 и rs9640883).

**Материал и методы.** В исследование включены 311 пациентов, которые были распределены на четыре группы: I группу составили 107 офтальмологически здоровых добровольцев (контроль); во II группу (n=76) вошли пациенты с I стадией ДР (без изменений на глазном дне); III группу (n=64) составили пациенты с непролиферативной, IV (n=64) — пациенты с пролиферативной ДР. Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли с использованием унифицированных тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США) в автоматическом амплификаторе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США).

**Результаты.** Показано наличие для украинской популяции ассоциации генетических полиморфизмов гена AKR1B1 с развитием ДР (мутантная аллель A полиморфизма rs759853 и генотип A/A повышает шансы ДР, соответственно, в 2,8 раза и в 5,2 раза ( $p < 0,001$ ). Определено влияние полиморфизма rs9640883 на развитие ДР ( $p < 0,001$ ): предковая аллель G повышает в 2,6 раза, а гомозигота G/G — в 3,0 раза шансы развития ДР. Наличие аллелей «риска» негативно влияло и на развитие ДР у больных на ЦД2Т, тогда как на развитие пролиферативной формы ДР эти полиморфизмы не влияли. Значение полиморфизма в развитии ДР было доказано результатами дисперсионного анализа (для rs759853 —  $F=18,9$ ;  $p < 0,001$  и для rs9640883 —  $F=6,9$ ;  $p=0,001$ ).

**Выводы.** Таким образом, нарастание тяжести ДР сопровождается снижением частоты предковой аллели G и увеличением частоты мутантной аллели A полиморфизма rs759853 гена AKR1B1. Показано значимое увеличение частоты предкового генотипа G/G полиморфизма rs9640883 гена AKR1B1 при ДР на фоне уменьшения частоты гетерозиготы G/A и исчезновения минорной гомозиготы A/A.

**Ключевые слова:** диабетическая ретинопатия, AKR1B1, rs759853, rs9640883

Поступила 16.01.2017