

Вопросы клинической офтальмологии

УДК 617.735-022:575.222:616.379-008.64

Прогнозування розвитку діабетичної ретинопатії на основі визначення поліморфних локусів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1

С. Ю. Могілевський¹, д-р мед. наук, проф., О. В. Бушуєва², асистент

¹ Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика Київ (Україна)

² Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького Львів (Україна)

E-mail: elsereda08@gmail.com

Вступ. Відповідно до сучасних даних, генетичним факторам відводять до 50% ризику розвитку діабетичної ретинопатії (ДР). Виявлення пацієнтів, схильних до розвитку ДР, сприятиме розробці індивідуального підходу до впровадження профілактичних заходів та лікування. Перспективним генетичним кандидатом, для якого доказаний зв'язок з розвитком ДР, є ген альдозоредуктази (AKR1B1) та його поліморфізми rs759853 і rs9640883.

Мета дослідження – прогнозування розвитку ДР на основі визначення поліморфних локусів гена AKR1B1.

Матеріал та методи. До дослідження залучено 409 осіб, які були розподілені на дві групи за наявності ДР: 1 групу склали 281 пацієнт без ДР, 2 групу – 128 пацієнтів з 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). Для аналізу зв'язку генотипу з ризиком розвитку ДР були використані методи побудови множинних логістичних моделей регресії в програмних середовищах Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) і SPSS Statistics v.22 (IBM Corp., USA).

Результати. В результаті проведених досліджень розроблена модель прогнозування розвитку ДР шляхом будування множинної регресії з достатньою надійністю ступеня впливу незалежних змінних на розрахунковий показник: $-2\text{Log-правдоподібність} = 354,467$ ($\chi^2=42,877$; $p<0,001$), $AUC=0,70\pm 0,03$ (ВІ 95% 0,62-0,76), $p=2,6E-09$. Найбільша ймовірність розвитку ДР (Р) була відмічена для гаплотипів (A/A rs759853*G/G rs9640883) – $P=0,610$, (G/A rs759853*G/G rs9640883) – $P=0,407$ та (A/A rs759853*G/A rs9640883) – $P=0,389$. Найменша ймовірність розвитку ДР ($P=0,047$) була визначена для проєктивного гаплотипу (G/G rs759853*A/A rs9640883). Загалом, значення ймовірності розвитку ДР більше 0,231 встановлювало позитивний результат, а менше або рівне 0,231 – вказувало на негативний результат з загальною коректністю прогнозу 66%.

Висновок. Таким чином доведено, що поліморфні локуси rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1 можуть використовуватися для прогнозування розвитку ДР та запропонована математична модель розрахунку такої ймовірності.

Ключові слова:

діабетична ретинопатія, AKR1B1, rs759853, rs9640883, прогностичні моделі регресії.

Актуальність. Цукровий діабет II типу (ЦД II) складає понад 90% в структурі захворювання на діабет та є мультифакторіальним захворюванням, в генезі якого певну вагу мають генетичні чинники [1]. Відповідно до сучасних даних, генетичним факторам відводять до 50% ризику розвитку ДР [2, 3]. Виявлення пацієнтів, схильних до розвитку ДР, сприятиме розробці індивідуального підходу до впровадження профілактичних заходів та лікування [4]. Рядом досліджень показана наявність спадковості при розвитку ДР в різних популяціях, незалежно від рівня гіперглікемії та супутніх факторів ризику навколишнього середовища [5, 6].

Поліоловий шлях метаболізму глюкози розглядають як зв'язок між гіперглікемією та розвитком ускладнень діабету [7, 8]. Альдозоредуктаза – фермент, який перетворює глюкозу на сорбітол в NADPH-залежній реакції [1, 8]. Внутрішньоклітинне накопичення сорбітолу є наслідком гіперглікемії та призводить до порушення осмотичного гомеостазу і відіграє есенціальну роль в розвитку ДР [1].

Ген AKR1B1 локалізується на 7-й хромосомі (7q35) і має 10 екзонів довжиною 18 тисяч пар нуклеотидів

ДНК [9]. За даними літератури, поліморфізми rs759853 та rs9640883 гена AKR1B1 мають асоціацію з розвитком ДР в різних популяціях [5, 6]. У наших попередніх дослідженнях встановлена наявність асоціативного зв'язку цих поліморфізмів з розвитком ДР [10]. Наступним етапом дослідження була розробка математичної моделі прогнозування розвитку ДР шляхом будування множинної регресії.

Мета дослідження – прогнозування розвитку ДР на основі визначення поліморфних локусів rs759853 і rs9640883 гена AKR1B1.

Матеріал і методи

Клінічні дослідження проведені на базі кафедри офтальмології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Молекулярно-генетичні дослідження виконувались в Науково-дослідному інституті експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Стадію ДР встановлювали відповідно до класифікації Американської академії офтальмології (2003). 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 безконтактних 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. 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: n.94+433 C>T).

Для аналізу зв'язку генотипу з ризиком розвитку ретинопатії були використані методи побудови та аналізу логістичних моделей регресії. Було проаналізовано дані 409 пацієнтів, розподілені за наявністю ДР. У першу групу увійшли 281 пацієнт, які зверталися у клініку з приводу обстеження функції зору та мали вікові дегенеративні зміни, катаракту тощо, але не мали ДР. У другу групу увійшли 128 пацієнтів з наявністю ДР. За результуючу ознаку обрано наявність ретинопатії (Y): Y=0 для пацієнтів без ретинопатії; Y=1 для пацієнтів з ДР. В якості факторних ознак аналіз проводився для генотипів поліморфізмів rs759853 та rs9640883 гена AKR1B1. Математичний аналіз результатів досліджень проводили за допомогою програм Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) і SPSS Statistics 22 (IBM Corp., USA). Використано модулі побудови множинних нелінійних логістичних регресійних моделей.

Результати та їх обговорення

На першому етапі для побудови регресійних моделей були виконані перетворення категоріальних величин у кількісні (індикаторні) (табл. 1).

Обчислювання коефіцієнтів регресії здійснено методом найбільшої правдоподібності. На етапі побудови регресійної моделі було проаналізовано вплив предикторів на наявність ДР (залежну змінну DR). Статистичне оцінювання розрахованих коефіцієнтів регресії показало їх високу вірогідність у порівнянні з нульовою гіпотезою: $t=4,032$; $p<0,001$ і $t=-3,166$; $p=0,002$ для β_1 і β_2 , відповідно (табл. 2).

Аналіз величин коефіцієнтів регресії (β_1 і β_2), які відображають відносний внесок відповідного предиктору (X_1 і X_2) в розрахунок загальної залежної змінної (DR), показав їх приблизну рівнозначність, але різноспрямованість напрямку дії: $\beta_1=0,827\pm 0,205$

Таблиця 1. Перетворення категоріальних змінних (поліморфних генотипів гена AKR1B1) в індикаторні змінні та їх відповідність змінним регресії

Назва	Характеристика та позначення змінних регресії	Категоріальне значення	Індикаторне значення
Поліморфізм rs759853	X_1 (предиктор, використано індикаторне значення)	G/G	101
		G/A	102
		A/A	103
Поліморфізм rs9640883	X_2 (предиктор, використано індикаторне значення)	G/G	101
		G/A	102
		A/A	103
Наявність ДР	DR (залежна змінна, використано індикаторне значення)	N	0
		Y	1
Ймовірність розвитку ДР	$P_{(DR)}$ (розрахункове кількісне значення)	-	-

Таблиця 2. Результат регресійного аналізу для залежної змінної DR (Так/Ні)

Показники	Умовне позначення β	β	SE_{β}	t	p	ВІ 95%
Вільний показник	β_0	6,056	1,748	2,936	0,012	2,654-8,755
X_1	β_1	0,827	0,205	4,032	<0,001	0,424-1,230
X_2	β_2	-0,899	0,284	-3,166	0,0021	-(1,457-0,341)

Примітка. β – коефіцієнт регресії; SE_{β} – стандартна похибка β ; t – критерій Ст'юдента; p – статистична значущість, ВІ 95% – 95% вірогідний інтервал β

(ВІ 95% 0,424-1,230) і $\beta_2 = -0,899 \pm 0,284$ (ВІ 95% -(1,457-0,341)).

Визначення основних характеристик множинної регресії в цілому показало достатню надійність ступеня впливу незалежних змінних на розрахунковий показник: $-2\text{Log-правдоподібність} = 354,467$ ($\chi^2 = 42,877$; $p < 0,001$). Операційні характеристики моделі наведені на рисунку 1.

Величина площі під операційною кривою підтверджує задовільні характеристики розробленої моделі: $AUC = 0,70 \pm 0,03$ (ВІ 95% 0,62-0,76), які статистично значимо ($p = 2,6E-09$) відрізнялися від таких, що прийняті для нульової гіпотези ($AUC = 0,5$).

Отримані результати дозволяють представити формулу розрахунку ймовірності розвитку ДР (Так/Ні) у такому вигляді:

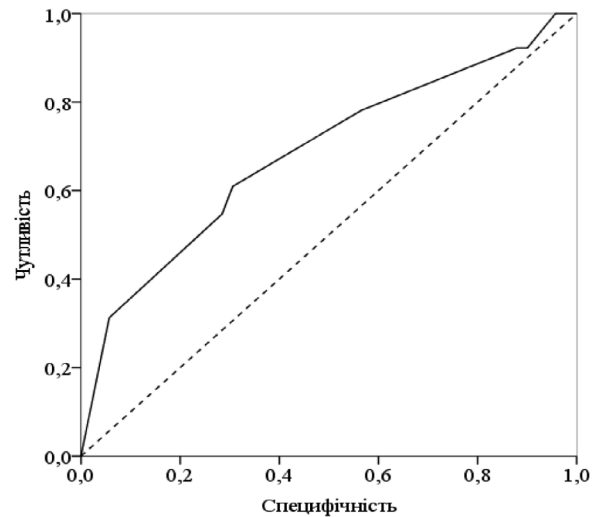
$$P_{(DR)} = 1 / (1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2)}) \quad (1)$$

де: $P_{(DR)}$ – розрахункове значення ймовірності розвитку ДР; X_1 – індикаторне значення rs759853; X_2 – індикаторні значення rs9640883; β_0 -2 – коефіцієнти регресії.

З точки зору практичного використання отриманого рівняння регресії здавалося здатним зіставити розрахункові значення $P_{(DR)}$ для пацієнтів без ДР і із захворюванням та визначити межові показники, що відповідають прогнозу наявності або відсутності молекулярно-генетичних передумов до розвитку ДР. Для цього був проведений статистичний аналіз показників $P_{(DR)}$ в групах порівняння і класифікаційний аналіз розподілу пацієнтів за фактичною наявністю чи відсутністю у них ДР у відповідності до розрахованих значень показника $P_{(DR)}$. Результати представлені в таблицях 3 і 4, відповідно.

Порівняння розрахованих значень $P_{(DR)}$ в групах пацієнтів без- і з ДР показало значущі відмінності ($t = -7,355$; $p = 1,06E-12$) між середніми величинами ймовірності розвитку ДР: $0,278 \pm 0,007$ (ВІ 95% 0,264-0,293) і $0,389 \pm 0,015$ (ВІ 95% 0,359-0,419), відповідно. Аналогічний висновок можна зробити при розгляді величин Mediana, Mode і Percentile 10-75.

Не дивлячись на досить задовільну кількість загальних коректних результатів (74,57%), звертає увагу низьке виявлення ДР у порівнянні з тим, що фактично отримано (31,25%). У зв'язку з цим, необхідно прийняти до уваги такі міркування. Залежна змінна логістичної регресії відповідає величині

**Рис. 1.** ROC-діаграма регресійної моделі прогнозування розвитку ДР**Таблиця 3.** Статистичні показники $P_{(DR)}$, що характеризують досліджені групи пацієнтів

Показники	Пацієнти без ДР	Пацієнти з ДР
$M \pm m$	0,278 \pm 0,007	0,389 \pm 0,015
Mediana	0,231	0,406
Mode	0,218	0,610
ВІ 95%	0,264-0,293	0,359-0,419
Percentile 10	0,206	0,218
Percentile 25	0,218	0,231
Percentile 75	0,406	0,610
Percentile 90	0,406	0,610
t	-7,355	
p	1,06E-12	

Примітки: $M \pm m$ – середнє значення і стандартна похибка; t – критерій Ст'юдента; p – статистична значущість

Таблиця 4. Результати класифікації пацієнтів з урахуванням прогнозованої та фактичної наявності ДР

Фактично	Розраховано		Коректних випадків	
	Ні	Так	%	загальний %
Ні	265	16	94,31	74,57
Так	88	40	31,25	

ймовірності (від 0 до 1) події, що має відбутися, тобто – чи розів'ється у пацієнта ДР? У той час як величина ймовірності (P), що розраховується і вище якої прогнозується подія, відповідає точці (порогу) відсічі та звичайно приймається такою, що більше 0,5. У той же час при практичному використанні рівнянь регресії важко встановити величину точки відсічі, яка задовольняє вимогам оптимальності, які висувуються до моделей прогнозування. При цьому необхідно зберегти баланс між правильно та помилково класифікованими (позитивними та негативними) випадками. Визначення точки відсічі залежить від конкретної задачі, яка стоїть перед дослідником, клінічної ситуації, використаних показників, допустимої питомої ваги того чи іншого виду помилок у формуванні бажаного прогнозу.

У цьому плані було розглянуто розподіл пацієнтів у групах з фактичною відсутністю або наявністю ДР у залежності від величини розрахованої ймовірності розвитку $P_{(ДР)}$, а, значить, й від генотипів обох вивчених поліморфізмів гена AKR1B1 у тих сполученнях (гаплотипи), які були виявлені у пацієнтів (табл. 5).

Найбільша ймовірність розвитку ДР була відмічена для гаплотипів (A/A rs759853*G/G rs9640883) – $P_{(ДР)}=0,610$, (G/A rs759853*G/G rs9640883) – $P_{(ДР)}=0,407$ та (A/A rs759853*G/A rs9640883) – $P_{(ДР)}=0,389$. Найменша ймовірність розвитку ДР ($P_{(ДР)}=0,047$) була визначена для проєктивного гаплотипу (G/G rs759853*A/A rs9640883).

Далі наведено результати розподілу коректних, хибнопозитивних та хибнонегативних результатів прогнозування розвитку ДР у залежності від величини точки відсічі (табл. 6).

Аналіз цієї таблиці показав, що зі збільшенням точки відсічі кількість пацієнтів з коректно розрахованим прогнозом розвитку ДР зростає, при цьому збільшується чутливість моделі. Разом з тим, показник специфічності знижується, тобто відбувається зменшення кількості коректних негативних результатів з одночасним збільшенням числа хибнонегативних прогнозів. Частіше всього моделі, що настроєні на високу чутливість дають ефективний прогноз позитивного кінця, тоді як, моделі з високою специфічністю більш реально відображають ймовірність негатив-

Таблиця 5. Величина ймовірність розвитку ДР в групах пацієнтів без та з ДР

Генотипи		$P_{(ДР)}$	Пацієнти без ДР, (n=281)		Пацієнти з ДР, (n=128)	
rs759853	rs9640883		n	%	n	%
G/G	A/A	0,047	3	1,068	-	0
G/A	A/A	0,102	9	3,203	-	0
G/G	G/A	0,109	16	5,694	10	7,812
A/A	A/A	0,206	6	2,135	-	0
G/A	G/A	0,218	88	31,317	18	14,062
G/G	G/G	0,231	73	25,879	22	17,185
A/A	G/A	0,389	6	2,135	8	6,25
G/A	G/G	0,407	64	22,776	30	23,437
A/A	G/G	0,610	16	5,694	40	31,25

Примітки: всі показники відсортовано по мірі зростання значень $P_{(ДР)}$

Таблиця 6. Результати розподілу коректних та хибних результатів ймовірності розвитку ДР у залежності від обраного значення точки відсічі

Точка відсічі $P_{(ДР)}$	Результати у пацієнтів без ДР, (n=281)		Результати у пацієнтів з ДР, (n=128)	
	коректні, %	хибно-позитивні, %	коректні, %	хибно-негативні, %
>0,047	1,068	98,932	100,000	0,000
>0,102	4,271	95,730	100,000	0,000
>0,109	9,964	90,036	92,187	7,813
>0,206	12,100	87,900	92,187	7,813
>0,218	43,416	56,584	78,125	21,875
>0,231	69,395	30,605	60,938	39,063
>0,389	71,530	28,470	54,688	45,313
>0,407	94,306	5,694	31,250	68,750
>0,610	100,000	0,000	0,000	100,000

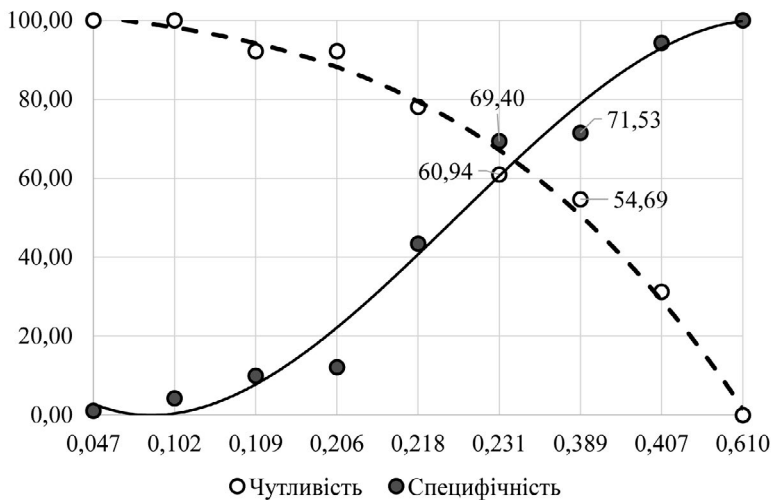


Рис. 2. Чутливість (переривчаста лінія) та специфічність (суцільна лінія) в залежності від значення точки відсічі.

По вертикальній осі – чутливість і специфічність у %; по горизонтальній – значення ймовірності розвитку ДР

ного кінця. Оптимальний баланс між чутливістю та специфічністю може бути встановлений за допомогою такої діаграми (рис. 2).

Аналіз чутливості та специфічності розробленої моделі показав, що значення $P_{(ДР)}$ більш 0,231 слід вважати позитивними щодо прогнозу розвитку ДР (див. табл. 6). Таким чином, значення ймовірності розвитку ДР більше або рівне 0,231 ($P_{(ДР)} \geq 0,231$), яке отримане з використанням розробленої формули регресії, встановлює наявність ДР з загальною правильністю прогнозу 66%.

Висновки

1. В результаті проведених досліджень розроблена модель прогнозування розвитку ДР шляхом будівництва множинної регресії з достатньою надійністю ступеню впливу незалежних змінних на розрахунковий показник: $-2\text{Log-правдоподібність} = 354,467$ ($\chi^2=42,877$; $p<0,001$), $AUC=0,70\pm 0,03$ (BI 95% 0,62-0,76), $p=2,6E-09$.

2. Найбільша ймовірність розвитку ДР була відмічена для гаплотипів (A/A rs759853*G/G rs9640883) – $P_{(ДР)}=0,610$, (G/A rs759853*G/G rs9640883) – $P_{(ДР)}=0,407$ та (A/A rs759853*G/A rs9640883) – $P_{(ДР)}=0,389$. Найменша ймовірність розвитку ДР ($P_{(ДР)}=0,047$) була визначена для проєктивного гаплотипу (G/G rs759853*A/A rs9640883).

3. Значення ймовірності розвитку ДР більше 0,231 встановлювало позитивний результат, а менше або рівне 0,231 – вказувало на негативний результат з загальною коректністю прогнозу 66%.

Література

1. **Паньків В. І.** Симпозіум № 162 "Цукровий діабет: діагностичні критерії, етіологія і патогенез" / В.І. Паньків // Міжнародний ендокринологічний журнал. – 2013. – № 8. – С. 53-64.
2. **Hietala K.** Heritability of proliferative diabetic retinopathy / K. Hietala, C. Forsblom, P. Summanen, P.H. Groop // Diabetes. – 2008. – Vol. 57. – P. 2176-2180.
3. **Cho H.** Genetics of diabetic retinopathy / H. Cho, L. Sobrin // Curr. Diab. Rep. – 2014. – Vol. 14, № 8. – P. 515.
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. **Abhary S.** 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.
6. **Sladek R.** 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 (7130). – P. 881-885.
7. **Suzen S.** Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications / S. Suzen, E. Buyukbingol // Curr. Med. Chem. – 2003. – Vol. 10, № 15. – P. 1329-1352.
8. **Chung S.S.** Aldose reductase in diabetic microvascular complications / S.S. Chung, S.K. Chung // Curr. Drug Targets. – 2005. – Vol. 6, № 4. – P. 475-486.
9. **Щулькин А.В.** Генетические маркеры развития диабетической ретинопатии / А.В. Щулькин, А.В. Колесников, О.И. Баренина, А.А. Никифоров // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 4. – С. 411-414.
10. **Могілевський С. Ю.** Зв'язок поліморфізмів rs759853 та rs9640883 гена AKR1B1 з розвитком діабетичної ретинопатії / С.Ю. Могілевський, О.В. Бушуєва, С.В. Зябіцев, Л.В. Натрус // Офтальмологічний журнал. – 2017. – № 2. – С. 3-7.

Поступила 24.04.20017

Прогнозирование развития диабетической ретинопатии на основе определения полиморфных локусов rs759853 и rs9640883 гена AKR1B1

Могилевский С.Ю.¹, Бушуева О.В.²

¹Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика

²Пльвовский национальный медицинский университет имени Данилы Галицкого

Вступление. В соответствии с современными данными, генетическим факторам отводят до 50% риска в развитии диабетической ретинопатии (ДР). Выявление пациентов, склонных к развитию ДР, будет способствовать разработке индивидуального подхода к внедрению профилактических мер и лечению. Перспективным геном-кандидатом, для которого доказана связь с развитием ДР, являются ген альдозоредуктазы (AKR1B1) и его полиморфизмы rs759853 и rs9640883.

Цель исследования – прогнозирование развития ДР на основе определения полиморфных локусов гена AKR1B1.

Материал и методы. В исследование включено 409 пациентов, которые были распределены на две группы по наличию ДР: 1 группу составил 281 пациент без ДР, 2 группу – 128 пациентов с 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). Для анализа связи генотипа с риском развития ДР были использованы методы построения множественных логистических моделей регрессии в программных средах

Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) и SPSS Statistics v.22 (IBM Corp., USA).

Результаты. В результате проведенных исследований разработана модель прогнозирования развития ДР путем построения множественной регрессии с достаточной надежностью влияния независимых переменных на расчетный показатель: $-2\text{Log-правдоподобие} = 354,467$ ($\chi^2=42,877$; $p<0,001$), $AUC=0,70\pm 0,03$ (CI 95% 0,62-0,76), $p=2,6E-09$. Наибольшая вероятность развития ДР (P) была отмечена для гаплотипов (A/A rs759853*G/G rs9640883) – $P=0,610$, (G/A rs759853*G/G rs9640883) – $P=0,407$ и (A/A rs759853*G/A rs9640883) – $P=0,389$. Наименьшая вероятность развития ДР ($P=0,047$) была определена для проективного гаплотипа (G/G rs759853*A/A rs9640883). В общем, значение вероятности развития ДР больше 0,231 устанавливало позитивный результат, а меньшее или равное 0,231 – указывало на негативный результат с общей корректностью прогноза 66%.

Выводы. Таким образом, доказано, что полиморфные локусы rs759853 и rs9640883 гена AKR1B1 могут использоваться для прогнозирования развития ДР, предложена математическая модель расчета такой вероятности.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, AKR1B1, rs759853, rs9640883, прогностические модели регрессии