

Вміст аргінази-1 у хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію з різною тривалістю цукрового діабету залежно від генотипу CYP2E1

Резюме. Актуальність. Аргіназа-1 — фермент, що експресується в ендотелії і може сприяти накопиченню оксидантів і виникненню судинної дисфункції. Ген CYP2E1 (rs2070676) кодує фермент, який бере участь у метаболізмі ліків, інактивації N-нітрозамінів, поліциклічних вуглеводів та інших низькомолекулярних сполук. **Мета:** вивчити вміст аргінази-1 у сироватці крові хворих на проліферативну діабетичну ретинопатію (ПДР) з різною тривалістю цукрового діабету 2-го типу (ЦД2) залежно від генотипу CYP2E1 як можливого чинника розвитку ендотеліальної дисфункції. **Матеріали та методи.** До обстеження були залучені 106 пацієнтів офтальмологічної клініки з встановленим діагнозом ПДР із тривалістю ЦД2 до і понад 20 років (групи ДГ-1 і ДГ-2 відповідно). Контрольну групу (КГ) становили 43 добровольці без діабету, порівнянні за віком і статтю з пацієнтами груп ДГ-1 і ДГ-2. Поліморфізм гена визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції RealTime на ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500. Вміст аргінази-1 визначали в сироватці крові методом ELISA (набір Human Arginase, Hycult Biotech). Порівнювали дані за критерієм Крускала — Уолліса в статистичній програмі SPSS 23. **Результати.** У групі ДГ-1 вміст аргінази-1 становив $12,66 \pm 11,81$ нг/мл, у групі ДГ-2 — $17,57 \pm 12,97$ нг/мл, що вірогідно не відрізнялося від значень КГ — $14,80 \pm 14,31$ нг/мл. У групі помірної ПДР вміст протеїну був в 1,7 раза вище, ніж у КГ, і становив $24,02 \pm 13,16$ нг/мл. У групі тяжкої ПДР — $10,70 \pm 7,24$ нг/мл, спостерігали зменшення у 2,4 раза порівняно з групою з помірною ПДР ($p < 0,05$). У пацієнтів із прогресуючою ПДР вміст аргінази-1 становив $13,24 \pm 11,93$ нг/мл. У носіїв мажорного генотипу (CC) гена CYP2E1 різниця була менш значною, і вміст аргінази-1 при поглибленні стадії ПДР із помірної до тяжкої зменшувався в 2 рази. У носіїв поліморфного варіанта гена вміст аргінази-1 у КГ був більше ніж в 2,6 раза ($p < 0,05$), при поглибленні стадії ПДР із помірної до тяжкої зменшувався в 3,5 раза ($p < 0,05$) і на стадії прогресуючої ПДР був вище в 1,8 раза ($p < 0,05$) порівняно з тяжкою ПДР. **Висновки.** На стадії помірної ПДР відбувається критичний вплив надекспресії аргінази, що є шкідливим для ендотеліальних клітин. Носії поліморфного варіанта CYP2E1, зокрема алелі G, були однаково поширені в популяції (14–17 %), але мали підвищену схильність до експресії аргінази-1 при розвитку ПДР. Це дані підтверджують уявлення про вплив оксидативно-нітрозативного стресу як базового механізму в патогенезі ендотеліальної дисфункції і виникненні мікросудинних аномалій.

Ключові слова: діабетична ретинопатія; цукровий діабет 2-го типу; генотип; аргіназа-1

Вступ

Діабетичні мікросудинні ускладнення, такі як ретинопатія, нефропатія і невропатія, є важливою причиною захворюваності та смертності в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу (ЦД2). Вивчення причин виникнення ЦД2 триває за багатьма напрямками через розуміння безлічі генетичних та екологічних факторів ризику виникнення захворювання. На часі

активне вивчення генів, їх поліморфних варіантів і зв'язку цих мутацій із фенотиповими ознаками, які й спричиняють погіршення метаболізму й обмінних процесів. Без сумнівів, саме такий шлях може надати інструменти для розширення знань про складний патогенез діабету, його судинних ускладнень, що приведе до поліпшення профілактики, діагностики й лікування [1].

Аргіназа, важливий фермент циклу сечовини, використовує L-аргінін як субстрат для виробництва сечовини й орнітину. Він експресується в кількох типах клітин, включно з ендотеліальними клітинами, макрофагами й гладком'язовими клітинами судин. Дослідження показали, що підвищена активність аргінази порушує функцію синтази оксиду азоту (NOS), викликаючи роз'єднання димеру NOS. Незв'язана молекула NOS замість оксиду азоту (NO) виробляє супероксид, який призводить до вироблення прозапального оксиданту пероксинітриту. Залишкове накопичення оксидантів в ендотелії є основним механізмом судинної дисфункції при низці мікроциркуляторних захворювань, включно з діабетичною ретинопатією (ДР) [2, 3].

Дослідження поліморфних варіантів гена аргінази на 740 неспоріднених пацієнтах із ЦД2 університетської лікарні Люблінського медичного університету підтвердило зв'язок мінорної алелі SNP rs2781666 у локусі ARG1 з ризиком ретинопатії [4]. Виявлено, що мінорна алель T і генотип TT підвищували ризик розвитку ЦД2 в 1,4 і 2,2 раза відповідно. Частоти алелі T і генотипу TT були вірогідно вищими в групі хворих на ЦД2 із ДР, ніж без ДР. Ризик розвитку ДР був у 1,7 раза вищим для алелі T і в 2,4 раза вищим для гомозиготного генотипу TT.

У моделях на мишах і щурах було показано, що індуковане діабетом порушення ендотеліальних вазодилатаційних відповідей у судинах сітківки пов'язане з активацією аргінази через збільшення її продукції. Цього можна було уникнути шляхом делеції однієї копії гена аргінази в мишей [5]. Однак механізм, за допомогою якого ген ARG1 забезпечує схильність до ДР, незрозумілий і вимагає вивчення. Більшість досліджень присвячено розподілу ферментів, що беруть участь у метаболізмі аргініну в структурах ока [6].

Численні дослідження продемонстрували значення генетичних поліморфізмів цитохромів P450 (CYP) у патогенезі ЦД2 [7]. Цитохром P450 2E1 (кодується геном CYP2E1) відповідає за метаболічну активацію багатьох низькомолекулярних сполук, включно з етанолом, бензолом, вінілхлоридом і N-нітрозамінами [8]. Над-експресований CYP2E1 демонструє високу здатність продукувати вільні радикали, які, імовірно, викликають перекисне окиснення ліпідів у пацієнтів з ожирінням і ЦД2, у яких показана підвищена активність CYP2E1 [9]. Однак залишається нез'ясованою роль поліморфізму гена CYP2E1 у розвитку ендотеліальної дисфункції та активації нітрозативно-окисливих механізмів у патогенезі ДР [8].

Мета роботи: вивчити вміст аргінази-1 у сироватці крові хворих на ПДР із різною тривалістю ЦД2 залежно від генотипу CYP2E1 як можливого чинника розвитку ендотеліальної дисфункції.

Матеріали та методи

До обстеження були залучені 106 пацієнтів офтальмологічної клініки з встановленим діагнозом ПДР. Пацієнти погоджувалися брати участь у дослідженні і власноруч підписували інформовану згоду. Усі біоетичні аспекти дослідження були розглянуті й затверджені комісією з біоетики Національного університету охо-

рони здоров'я України імені П.Л. Шупика (протокол № 1 від 11.01.2021). Усім хворим були виконані загальноприйняті офтальмологічні обстеження: візометрія, рефрактометрія, статична периметрія Humphrey, тонометрія, біомікроскопія, за необхідності — гоніоскопія, офтальмоскопія лінзою Goldman, оптична когерентна томографія на OCTDRI Triton (Topcon, 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). Флуоресцентну ангіографію виконували за показаннями. Відповідно до шкали ETDRS у пацієнтів визначали помірну (PDR), тяжку (High-risk PDR) і прогресуючу ПДР (Advans PDR).

За тривалістю ЦД2 пацієнтів поділили на 2 групи. У пацієнтів ДГ-1 (n = 46, жінок 56 %) середній вік (Me [Q1-Q3]) становив 62 [57–66] роки, тривалість ЦД2 визначалася до 20 років. У пацієнтів ДГ-2 (n = 60, жінок 53 %) із середнім віком 65 [60–68,25] років діабет тривав понад 20 років. Групу порівняння (контрольну — КГ) становили добровольці (n = 43, жінок 56 %), без ознак цукрового діабету та ретинопатії, які звернулися з метою профілактичного огляду в клініко-діагностичну лабораторію Університетської клініки НМУ імені О.О. Богомольця і були порівнянні за віком із пацієнтами з ПДР.

Для дослідження була використана венозна кров. Забір проводили в умовах маніпуляційного кабінету в пробірці з фіолетовою кришкою об'ємом 4 мл, що містили EDTA K3 як антикоагулянт. Після центрифугування відбирали в окрему пробірку типу Епендорф плазму для дослідження ІФА, а осад (шар із клітинами) залишали для генетичних досліджень. Матеріал маркували й заморожували 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 з Digestion Buffer і протеїназою K і шляхом центрифугування позбувались продуктів денатурації та лізису, з метою запобігання контамінації додатково інкубували з РНКазою. Для аналізу поліморфних ДНК-локусів використовували уніфіковані тест-системи TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США). Досліджували поліморфізм rs2070676 гена CYP2E1. Інкубацію досліджуваного матеріалу проводили із системою праймерів, які фланкують ділянки ДНК генів, що аналізуються, у присутності ДНК-полімерази в ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). За допомогою синхронізованої з ампліфікатором програми RealTime_PCR обробляли дані.

Вміст аргінази-1 визначали в плазмі крові методом твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) на напівавтоматичному аналізаторі RT2100C (RAYTO) (Китай) із використанням набору Elabscience (Human Arginase, Hycult Biotech) у лабораторії Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця.

Для підвищення вірогідності отриманих результатів оцінки асоціацій між досліджуваними показниками КГ

і ПДР здійснювали розрахунок показників співвідношення шансів (odds ratio, OR) зі стандартною похибкою відношення шансів (S) і пов'язаним з ним 95% довірчим інтервалом (95% confidence interval, 95% CI). Значення показника OR розраховували за формулою:

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

де A — кількість випадків, коли є фактор ризику, і наслідок, B — кількість випадків, коли є фактор ризику, однак немає наслідку, C — кількість випадків, коли немає фактору ризику, однак є наслідок, а D — кількість випадків, коли немає ні фактора ризику, ні наслідку. Враховували, що значення OR, яке перевищує 1, означає, що шанси виявити фактор ризику більше в групі з наявністю результату. Це означає, що в такому випадку фактор має прямий зв'язок з імовірністю настання результату. Отже, значення OR показує, у скільки разів шанси певного результату в ДГ вищі, ніж у КГ. Для розрахунків під час проведення статистичного аналізу використовували онлайн-калькулятор (<https://mathcracker.com/>) підрахунку OR і програму Microsoft Excel.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою ліцензованого (користувач — НМУ імені О.О. Богомольця) статистичного пакета IBM SPSS Statistics, версія 23.0 (SPSS Inc., США). Більшість параметрів не відображали нормальний розподіл, тому використовували непараметричні критерії. Дані були описані як медіана і середнє квадратичне відхилення ($Me \pm \sigma$). Для інтервальної оцінки медіани розраховували 95% довірчий інтервал, який вказували при наведенні графічного матеріалу у вигляді діаграм або Box-plot-діаграм, де центральна коробка являє собою значення від нижнього до верхнього квартиля (від 25-го до 75-го процентиля). Середня лінія являє собою медіану. Рядок простягається від мінімального до максимального значення. Дані в групах порівнювали за допомогою рангового однофакторного аналізу за критерієм Крускала — Уолліса, для попарного порівняння використовували критерій Данна або Манна — Уїтні з урахуванням поправки Бон-

ферроні. Відмінності в групах подавали у вигляді P із вказуванням рівня значущості. Вважали, що дані відрізняються за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Вміст аргінази-1 у пацієнтів та осіб КГ вірогідно не відрізнявся і мав суттєву варіабельність. У загальній групі пацієнтів він становив $13,9 \pm 12,5$ нг/мл, у КГ — $14,80 \pm 14,31$ нг/мл. Залежно від тривалості основного захворювання різниця була невірогідною, відзначалась тенденція до зменшення аргінази-1 у пацієнтів у перші 20 років ЦД2 і підвищення з роками (рис. 1). У групі ДГ-1 вміст аргінази-1 становив $12,66 \pm 11,81$ нг/мл, у групі ДГ-2 — $17,57 \pm 12,97$ нг/мл. Вивчення вмісту аргінази-1 залежно від стадії ПДР показало іншу тенденцію. У групі помірної ПДР вміст протеїну становив $24,02 \pm 13,16$ нг/мл, у групі тяжкої ПДР — $10,70 \pm 7,24$ нг/мл, що вірогідно — у 2,4 раза — відрізнялося від вмісту в пацієнтів з помірною ПДР ($p < 0,05$), а у пацієнтів з прогресуючою ПДР становив $13,24 \pm 11,93$ нг/мл.

Для визначення ролі поліморфізму гена CYP2E1 у розвитку ПДР на тлі ЦД2 ми провели аналіз розподілу частоти зустрічаємості алелей і генотипів гена в дослідних групах з визначенням показника співвідношення шансів. Дані наведені в табл. 1.

Виявлено, що серед досліджених осіб переважають особи з мажорним генотипом CC, яких серед пацієнтів було 66 %, а в КГ — 72 %, у решти контингенту ми виявили гетерозиготний поліморфізм CG. Мінорний генотип GG гена CYP2E1 не був виявлений. Отже, носіїв алелі C серед усіх досліджуваних була переважна більшість — 83 і 86 %. Аналіз співвідношення шансів за нашими даними також показав відсутність асоціацій поліморфізму CG із розвитком ПДР на тлі ЦД2.

Аналіз вмісту аргінази-1 у плазмі крові в КГ показав як суттєву варіабельність у досліджуваних осіб, так і значну різницю залежно від генотипу гена CYP2E1. У групі ДГ-2 і КГ була схожа тенденція, вміст аргінази-1 був у 1,5 раза вище в носіїв мажорного генотипу CC. Вміст аргінази-1 у пацієнтів з ДГ-1 не відрізнявся

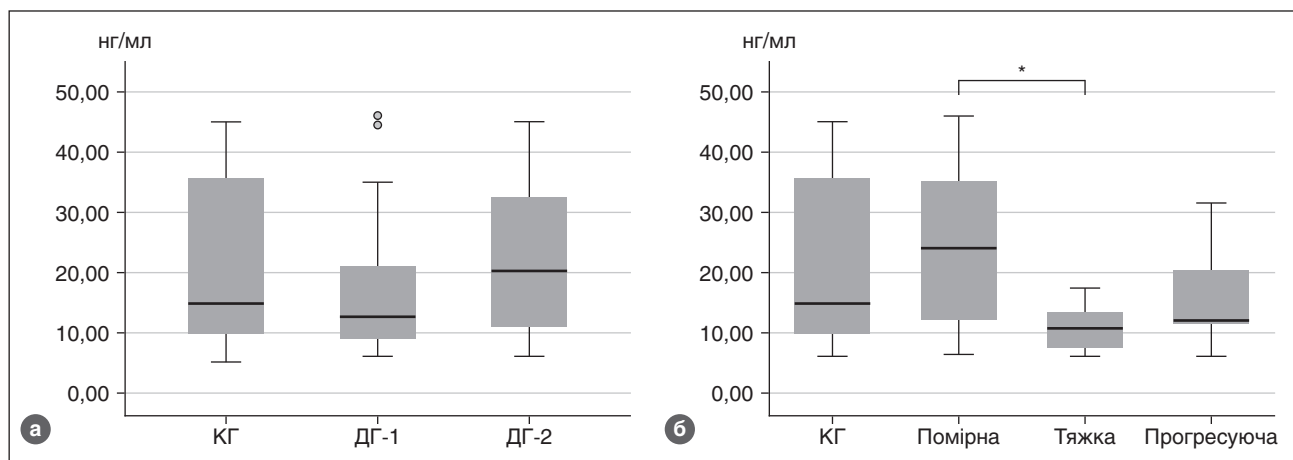


Рисунок 1. Вміст аргінази-1 у плазмі крові хворих на ПДР: а) у групах пацієнтів з різною тривалістю ЦД2; б) у групах пацієнтів з різними стадіями ПДР

Примітка: * — $p < 0,05$.

Таблиця 1. Результати розрахунку оцінки асоціацій між носіями різних генотипів гена CYP2E1 у групі пацієнтів із ПДР і ЦД2 та осіб КГ через визначення OR і ДІ

rs2070676	ПДР + ЦД2 (n = 106)	%	КГ (n = 43)	%	OR	ДІ
CC	70	66	31	72	0,75	0,34–1,63
CG	36	34	12	28	1,32	0,61–2,89
GG	0		0			
C	176	83	74	86	0,79	0,39–1,60
G	36	17	12	14	1,26	0,62–2,55

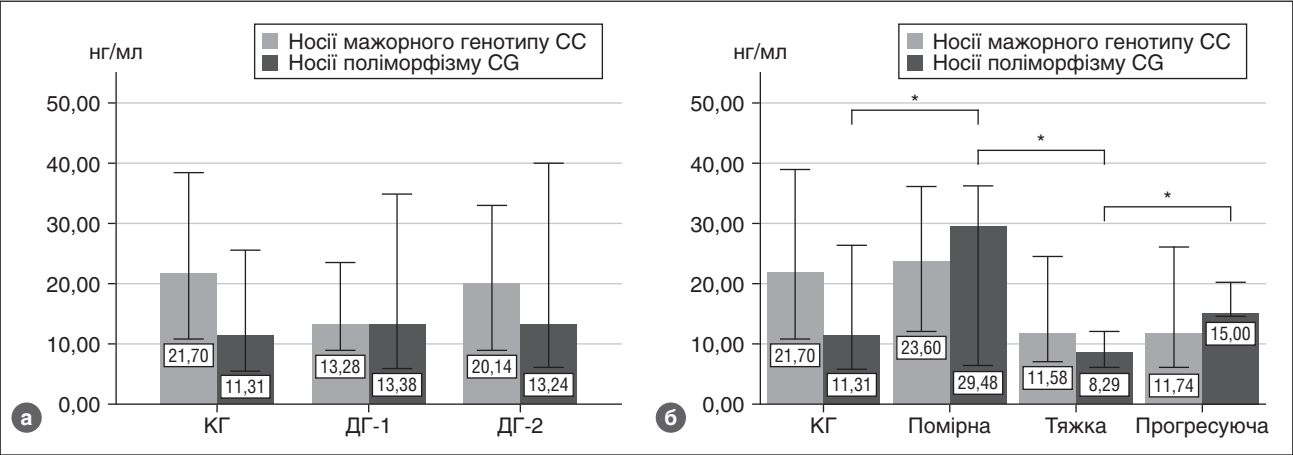


Рисунок 2. Вміст аргінази-1 у плазмі крові осіб з різним генотипом гена CYP2E1: а) у групах пацієнтів із різною тривалістю ЦД2; б) у групах пацієнтів із різними стадіями ПДР

Примітка: * — $p < 0,05$.

залежно від генотипу. Якщо підвищення рівня аргінази-1 у плазмі крові вважається фактором ризику для виникнення судинних ускладнень через ушкодження ендотелію, то наявність поліморфізму CG можна вважати протекторною щодо ендотеліальної дисфункції при початковій стадії ЦД2, яка не перевищує 20 років. Однак ми не виявили статистичних відмінностей, тому ця думка висловлена як припущення.

Розвиток і поглиблення ПДР супроводжувалося підвищенням вмісту аргінази-1 у плазмі крові й поступовим зменшенням рівня ферменту протягом прогресування захворювання. У носіїв мажорного генотипу різниця була менш значною, і вміст аргінази-1 при поглибленні стадії з помірної до тяжкої зменшувався у 2 рази. З огляду на значну варіабельність показника ми не отримали статистично вірогідні відмінності. У носіїв поліморфного варіанта гена вміст аргінази-1 був більше, ніж у КГ, у 2,6 рази ($p < 0,05$), при поглибленні стадії з помірної до тяжкої зменшувався в 3,5 рази ($p < 0,05$) і на прогресуючій стадії був вище у 1,8 рази ($p < 0,05$) порівняно з тяжкою ПДР.

Вміст аргінази в плазмі досліджуваних осіб показав суттєву розбіжність і варіабельність, вірогідно це пояснюється поширеністю ферменту в тканинах і клітинах організму [10]. Дослідження продемонстрували участь аргінази в патогенетичних каскадах при розвитку гіпертонії, ожиріння, діабету тощо [2, 11, 12]. У даний час аргіназа розглядається науковою спільнотою як потен-

ційний біомаркер перебігу й тяжкості цих захворювань. Автори стверджують, що аргіназа може сприяти прогресуванню ЦД2 і його ускладнень завдяки своїй регулюючій ролі у функціях β -клітин, інсулінорезистентності та судинної дисфункції через опосередкування метаболізму L-аргініну, запальних реакцій та окисного стресу [13].

Наші дані про вміст аргінази в пацієнтів були вкрай несподіваними, оскільки нашою нульовою гіпотезою було підвищення аргінази-1 у хворих із ПДР. Дослідження вмісту аргінази залежно від тривалості ЦД2 і поглиблення ПДР показали підвищення аргінази в пацієнтів з ПДР на тлі ЦД2 тривалістю понад 20 років. І максимальним вміст ферменту був у хворих з помірною ПДР, коли захворювання переходить саме в стадію проліферації і активуються судинні механізми ушкодження сітківки. Подальше поглиблення ретинопатії вже не супроводжується високою активністю аргінази-1. Це дає нам підставу вважати, що саме на стадії помірної ПДР відбувається критичний вплив надекспресії аргінази, що є шкідливим для ендотеліальних клітин.

Є думка про те, що продукція гена CYP2E1 відіграє вирішальну роль у розвитку ЦД2 через механізми впливу на вільні форми кисню в пацієнтів з ожирінням [7, 9]. Надекспресований CYP2E1 демонструє високу здатність продукувати вільні радикали, які, імовірно, спричиняють пошкодження печінки й перекисне окиснення ліпідів. За нашими даними, носії поліморфного варіанта CYP2E1, зокрема алелі G, були однаково поширені в

популяції, але мали підвищену схильність до експресії аргінази-1 при розвитку ПДР. Що також є підставою вважати механізми впливу оксидативно-нітрозативного стресу базовими в патогенезі ендотеліальної дисфункції та виникненні мікросудинних аномалій.

Висновки

Отже, клінічні й експериментальні дослідження свідчать про те, що аргіназа може бути біомаркером і діагностичним параметром ЦД2 і ПДР як його ускладнення. Однак не існує стандарту клінічного визначення активності аргінази або рівня експресії ферменту в крові для діагностики цих захворювань. Дослідження в цьому напрямку є багатообіцяючим підходом, який сформує нові поштовхи для розробки фармацевтичних інгібіторів аргінази, удосконалення фармакологічної терапії ПДР на тлі ЦД2.

Конфлікт інтересів. Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів і власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

Список літератури

1. Visaria J., Iver N.N., Raval A., Kong S., Hobbs T., Bouchard J., Kern D.M., Willey V. Incidence and prevalence of microvascular and macrovascular diseases and all-cause mortality in type 2 diabetes mellitus: A 10-year study in a US commercially insured and Medicare Advantage population. *Clin. Ther.* 2019. 41. 1522-1536. doi: 10.1016/j.clinthera.2019.05.012.
2. Wang S., Fang F., Jin W.B., Wang X., Zheng D.W. Assessment of serum arginase 1, as a type 2 diabetes mellitus diagnosis biomarker in patients. *Exp. Ther. Med.* 2014. 8. 585-590. doi: 10.3892/etm.2014.1768.
3. Romero M.I., Platt D.H., Tawfik H.E., Labazi M., Remessy A.B., Bartoli M., Caldwell R., Caldwell R.W. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ. Res.* 2008. 102. 95-102. doi: 10.1161/CIRCRESA-HA.107.155028.
4. Buraczynska M., Zakrocka I. Arginase Gene Polymorphism Increases Risk of Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *J. Clin. Med.* 2021 Nov 19. 10(22). 5407. doi: 10.3390/jcm10225407. PMID: 34830689; PMCID: PMC8620112.
5. Elms S.C., Togue H.A., Rajas M., Xu Z., Caldwell R.W., Caldwell R.B. The role of arginase 1 in diabetes-induced retinal vascular dysfunction in mouse and rat models of diabetes. *Diabetologia.* 2013. 56. 654-662. doi: 10.1007/s00125-012-2789-5.
6. Narayanan S.P., Rojas M., Suwanpradid J., Togue H.A., Caldwell W., Caldwell R.B. Arginase in retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 2013. 36. 260-280. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.06.002.
7. Zhang L., Tang J., Wang Y., Wang X., Wang F. Association of CYP7A1 and CYP2E1 Polymorphisms with Type 2 Diabetes in the Chinese Han Populations. *Pharmgenomics Pers. Med.* 2022. 15. 843-855.
8. Arinç E., Arslan S., Bozcaarmutlu A., Adali O. Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food Chem. Toxicol.* 2007 Jan. 45(1). 107-118. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.026. Epub 2006 Aug 30. PMID: 17034923.
9. Wang Z., Hall S.D., Maya J.F. et al. Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2003. 55(1). 77-85. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01731.x https://doi.org/10.2147/PGPM.S367806.
10. Ming X.F., Rajapakse A.G., Yepuri G. et al. Arginase II promotes macrophage inflammatory responses through mitochondrial reactive oxygen species, contributing to insulin resistance and atherogenesis. *Journal of the American Heart Association.* 2012. 1(4). doi: 10.1161/JAHA.112.000992.
11. Adebayo A.A., Oboh G., Ademosun A.O. Effect of dietary inclusion of almond fruit on sexual behavior, arginase activity, pro-inflammatory, and oxidative stress markers in diabetic male rats. *Journal of Food Biochemistr.* 2021. 45(3). doi: 10.1111/jfbc.13269.
12. Ren Y., Li Z., Li W., Fan X., Han F., Huang Y., Yu Y., Qian L., Xiong Y. Arginase: Biological and Therapeutic Implications in Diabetes Mellitus and Its Complications. *Oxid Med. Cell. Longev.* 2022 Oct 26. 2022. 2419412. doi: 10.1155/2022/2419412. PMID: 36338341; PMCID: PMC9629921.
13. Zhou Z., Mahdi A., Tratsiakovich Y. et al. Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase I. *Journal of the American College of Cardiology.* 2018. 72(7). 769-780. doi: 10.1016/j.jacc.2018.05.052.

Отримано/Received 10.02.2023

Рецензовано/Revised 24.02.2023

Прийнято до друку/Accepted 02.03.2023 ■

Information about author

V. M. Hanyuk, PhD student at the Department of ophthalmology, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine; <https://orcid.org/0000-0001-6368-2916>

Conflicts of interests. Author declares the absence of any conflicts of interests and own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of the manuscript.

V.M. Hanyuk

Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Arginase-1 content in patients with proliferative diabetic retinopathy with different duration of diabetes depending on the CYP2E1 genotype

Abstract. Background. Arginase-1 is an enzyme that is expressed in the endothelium and can contribute to the accumulation of oxidants and the occurrence of vascular dysfunction. The CYP2E1 gene (rs2070676) encodes an enzyme involved in drug metabolism, inactivation of N-nitrosamines, polycyclic carbohydrates,

and other low-molecular-weight compounds. The purpose of the work is to study the content of arginase-1 in the blood serum of patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) with different duration of type 2 diabetes depending on the CYP2E1 genotype as a possible factor for the development of endothelial

dysfunction. **Materials and methods.** One hundred and six patients of the ophthalmology clinic with a diagnosis of PDR and type 2 diabetes duration of up to and over 20 years (groups G-1 and G-2) were involved in the study. The control group (CG) consisted of 43 volunteers without diabetes who were comparable in terms of age and gender to the patients from groups G-1 and G-2. Gene polymorphism was determined using real-time polymerase chain reaction on the GeneAmp® PCR System 7500 amplifier. The content of arginase-1 in the blood serum was evaluated by the enzyme-linked immunosorbent assay (Human Arginase kit, Hycult Biotech). Data were compared using the Kruskal-Wallis test in the SPSS 23 statistical program. **Results.** In the G-1 group, the level of arginase-1 was 12.66 ± 11.81 ng/ml, in the G-2 group, 17.57 ± 12.97 ng/ml, which was not significantly different from the CG values of 14.80 ± 14.31 ng/ml. In the group with moderate PDR, the protein content was 1.7 times higher than in the CG and was 24.02 ± 13.16 ng/ml. In the group of severe PDR, protein level was 10.70 ± 7.24 ng/ml, a 2.4-fold decrease was observed compared to the group with moderate PDR ($p < 0.05$). In patients with

progressing PDR, the content was 13.24 ± 11.93 ng/ml. In carriers of the major (CC) genotype of the CYP2E1 gene, the difference was less significant, and the content of arginase-1 at the stage of PDR progression from moderate to severe decreased by 2 times. Among carriers of the polymorphic variant of the gene, the content of arginase-1 in the CG was more than 2.6 times higher ($p < 0.05$), at the stage of aggravation from moderate PDR to severe, it decreased by 3.5 times ($p < 0.05$) and at the advanced PDR stage, it was 1.8 times higher ($p < 0.05$) in comparison with severe PDR. **Conclusions.** At the stage of moderate PDR, there is a critical effect of arginase overexpression, which is harmful to endothelial cells. Carriers of the CYP2E1 polymorphic variant, in particular the G allele, were equally common in the population (14–17 %) but had an increased tendency to express arginase-1 in PDR development. These data confirm the idea about the effect of oxidative-nitrosative stress as a basic mechanism in the pathogenesis of endothelial dysfunction and the occurrence of microvascular abnormalities.

Keywords: diabetic retinopathy; type 2 diabetes; genotype; arginase-1