

УДК 617.735-002-02:616.633.66+577

DOI: 10.22141/2224-0721.13.7.2017.115745

 Гудзь А.С.¹, Зяблицев С.В.², Захаревич Г.Є.¹
¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

² Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Вплив поліморфізмів rs2010963 і rs699947 гена VEGFA на клінічні та лабораторні показники при діабетичній ретинопатії у хворих на цукровий діабет 2-го типу

For cite: Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal. 2017;13(7):471-477. doi: 10.22141/2224-0721.13.7.2017.115745

Резюме. Актуальність. Ключовим фактором розвитку неоангіогенезу при діабетичній ретинопатії (ДР) за умов цукрового діабету 2-го типу (ЦД-2) є васкуло-ендотеліальний фактор росту (VEGF). На важливу роль генетичних поліморфізмів гена VEGFA вказує низка досліджень і метааналізи, які показали наявність їх асоціації з ДР, особливо з її проліферативним варіантом (ДПР), що варіює у різних популяціях. **Мета.** З'ясування впливу поліморфних генотипів rs2010963 і rs699947 гена VEGFA на клінічні та лабораторні показники при ДР у хворих на ЦД-2 з української популяції. **Матеріали та методи.** До дослідження було залучено 302 хворих на ЦД-2 з ДР. Встановлення діагнозу проводилася за Міжнародною клінічною класифікацією, прийнятою Американською академією офтальмології (2003). Контрольну групу становили 98 осіб, які не мали ЦД-2 та ДР, а також інших офтальмологічних захворювань. Всі пацієнти були прооперовані з приводу катаракти. У внутрішньоочній рідині (ВОР), яку збирали під час операції, методом імуноферментного аналізу було визначено вміст VEGFA. Аналіз поліморфних ДНК-локусів гена VEGFA — rs2010963 і rs699947 — здійснювали за методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США). **Результати.** Аналіз результатів дослідження показав, що поліморфізм rs2010963 мав вплив на рівень у ВОР VEGFA (максимум — при генотипі ризику С/С). Цей поліморфізм був пов'язаний зі статтю (генотип С/С частіше зустрічався у чоловіків, ніж у жінок — 3 : 1), наявністю ДПР (найчастіше була визначена за наявності генотипу С/С: 45,4 %) та неоваскуляризацією диска зорового нерва (найчастіше була визначена за наявності гетерозиготи G/C: 21,4 %). Поліморфізм rs699947 мав вплив на гостроту зору (мінімальна наявна при генотипі С/С), товщину сітківки (максимальний показник — при генотипі С/С), рівень у ВОР VEGFA (максимальний рівень — при генотипі С/С), а також наявність ДПР та гемофтальму (найчастіше були визначені за генотипом С/С, відповідно 44,7 та 27,7 %). **Висновки.** Патогенетичний вплив генотипу ризику С/С поліморфізму rs2010963 частіше визначався у чоловіків, реалізувався завдяки високому рівню у ВОР VEGFA та проявлявся максимальною частотою ДПР. Патогенетичний вплив генотипу ризику С/С поліморфізму rs699947 також реалізувався завдяки високому рівню у ВОР VEGFA, призводив до зниження гостроти зору, потовщення сітківки та проявлявся максимальною частотою ДПР і гемофтальму.

Ключові слова: діабетична ретинопатія; поліморфізм гена VEGFA; rs2010963; rs699947

Вступ

В Україні, як і в усьому світі, кількість хворих на цукровий діабет (ЦД) збільшується з кожним роком [1, 2]. Під час проведення скринінгових обстежень на ЦД, щороку виявляють 3–4 хворих із уперше діагностованим ЦД на кожного зареєстрованого раніше [2, 3]. До основних ускладнень ЦД належать ураження очного дна, судин нирок і нижніх кінцівок [4, 5].

Внаслідок епідемії ЦД одним із пріоритетів у офтальмології є проблема діабетичної ретинопатії (ДР) [4, 6–8]. Протягом перших десяти років захворювання на ЦД частота розвитку ДР збільшується з 20 до майже 50 % [2]. Факторами ризику розвитку ДР є гіперглікемія, гіпертензія, гіперліпідемія [5–7]. Сучасними дослідженнями показано, що розвиток ДР залежить не тільки від рівня та тривалості гіпер-

глікемії, але й від генетичних чинників, оскільки навіть при суворому глікемічному контролі спостерігаються ретинальні ушкодження у певної частки пацієнтів із ЦД 2-го типу (ЦД-2) [9, 11, 12]. Ключовим фактором розвитку неоангіогенезу при ДР є васкуло-ендотеліальний фактор росту (VEGF). На важливість саме VEGFA та визначальну роль генетичних поліморфізмів, які впливають на експресію його гена, вказували дослідження, метааналізи [11–14] та розширений огляд P. Priscaкова et al. [15]. У метааналізі Lu Yan et al. показана наявність асоціації двох поліморфізмів гена VEGFA — rs2010963 та rs699947, що варіює у різних популяціях [16].

Метою цієї роботи було з'ясування впливу поліморфних генотипів rs2010963 і rs699947 гена VEGFA на клінічні та лабораторні показники при ДР у хворих на ЦД-2.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на базі кафедри офтальмології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Всі дослідження проводили з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження» (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Загалом до даного дослідження було залучено 302 особи. Встановлення діагнозу проводилося за Міжнародною клінічною класифікацією, прийнятою Американською академією офтальмології (2003). Контрольну групу становили 98 осіб, які не мали ЦД-2 та ДР, а також інших офтальмологічних

захворювань. Всі пацієнти були прооперовані з приводу катаракти.

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 і безконтактних лінз (Volk Optical, США), фотографування очного дна в семи ділянках згідно з протоколами дослідження ETDRS та флуоресцентну ангиографію на фундус-камері Topcon TRC NW7 SF (Японія), спектральну оптичну когерентну томографію на Optovue RTVue (Optovue, США). Визначали максимальну гостроту зору з корекцією (МГЗК, од.), внутрішньоочний тиск (ВОТ, мм рт.ст.); при оптичній когерентній томографії (ОКТ) визначали центральні товщину (ЦТС, мкм) та об'єм сітківки (ЦТО, мм³).

Забір внутрішньоочної рідини (ВОР) здійснювали через парацентез передньої камери до початку факоемульсифікації катаракти шляхом аспірації 0,05–0,1 мл через одноразовий шприц (Hemoplast, Etalon+, Україна) об'ємом 1,0 мл. Визначення VEGFA у ВОР проводили методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем eBioscience Thermo Fisher Sci. (США). Проводили двократне розведення проб, результати виражали у пг/мл.

Аналіз поліморфних ДНК-локусів гена VEGFA rs2010963 і rs699947 здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США).

Статистичний аналіз результатів клінічних досліджень проводили за допомогою пакета програм

Таблиця 1. Вплив генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGFA на кількісні показники

Показники	Me (Q _I –Q _{III})			H	p
	G/G, n = 92	G/C, n = 89	C/C, n = 22		
Вік, роки	66,0 (62,0–73,0)	66,0 (60,0–72,0)	65,0 (61,0–75,0)	0,38	0,83
Тривалість діабету, роки	6,0 (4,0–11,0)	7,0 (3,0–12,0)	11,0 (6,0–14,0)	3,87	0,14
Глюкоза крові, ммоль/л	7,9 (6,7–9,7)	8,1 (6,5–10,0)	9,6 (8,1–10,5)	6,40	0,04
HbA1c, %	7,7 (6,9–8,90)	7,8 (7,1–9,1)	8,3 (7,7–9,0)	3,33	0,19
МГЗК, од.	0,6 (0,3–0,8)	0,7 (0,2–0,9)	0,7 (0,1–0,9)	0,84	0,66
ВОТ, мм рт.ст.	18,0 (16,0–19,0)	16,0 (15,0–19,0)	16,0 (14,0–19,0)	5,79	0,06
ЦТС, мкм	275,0 (230,0–352,0)	265,0 (245,0–350,0)	256,5 (222,0–317,0)	1,85	0,39
ЦОС, мм ³	7,1 (5,9–7,7)	6,9 (6,3–7,9)	6,8 (5,9–8,0)	0,41	0,81
VEGFA, пг/мл	643,5 (545,5–824,0)	1003,0 (825,0–1432,0)	1712,0 (1520,0–1950,0)	102,9	< 0,001

Примітки: n — число спостережень; Me — медіана; Q_I і Q_{III} — 1-й і 3-й квартилі вибірок даних відповідно; H — критерій Kruskal — Wallis ANOVA by ranks; p — статистична значущість відмінностей порівняно з нульовою гіпотезою (прийнята при p < 0,05).

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 за рівнем 0,05. Для оцінки впливу поліморфних генотипів rs2010963 і rs699947 гена VEGFA, враховуючи відмінний від нормального розподіл даних, використовували ранговий дисперсійний аналіз (Kruskal — Wallis ANOVA by ranks). Цей метод перевіряє нульову гіпотезу на рівність медіан порівнюваних груп, використовуючи ранги вихідних значень. Для аналогічної оцінки якісних показників користувалися таблицями крос-табуляції і оцінним критерієм ксі-квадрат Pearson с поправкою Yetes. Окремо було проаналізовано вплив кожного з поліморфізмів на кількісні та якісні показники хворих на ДР.

Результати

Як свідчили дані, наведені у табл. 1, вік хворих за наявності різних генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGFA не відрізнявся ($p = 0,83$).

Тривалість ЦД у носіїв мінорної гомозиготи C/C була більшою, ніж у носіїв предкової гомозиготи G/G та гетерозиготи G/C (відповідно на 5 та 4 роки), але ця тенденція не мала статистичної значущості ($p = 0,14$). Рівень глюкози у крові статистично значуще ($p = 0,04$) був вищим у носіїв генотипу ризику C/C — у 1,8 раза порівняно з носіями генотипу G/G та у 1,6 раза порівняно з носіями генотипу G/C. Рівень глікованого гемоглобіну (HbA1c) також був більшим у носіїв генотипу ризику C/C, але ця розбіжність не мала статистичної значущості ($p = 0,19$). За показниками максимальної гостроти зору з корекцією, ВОТ, ЦТС та ЦОС статистичної значущості різниць у носіїв різних генотипів виявлено не було ($p > 0,05$ для всіх показників).

Найбільший ступінь залежності від генотипу мав рівень у ВОР VEGFA ($\chi^2 = 102,9$; $p < 0,001$), який був максимальним у носіїв генотипу ризику C/C — у 2,7

раза вищим за носіїв предкового генотипу G/G та у 1,6 раза — за носіїв гетерозиготного генотипу G/C.

Аналіз впливу поліморфізму rs2010963 гена VEGFA на якісні показники наведено у табл. 2. Було з'ясовано, що якщо предковий генотип G/G та гетерозиготний генотип G/C частіше виявлялися у жінок (76,1 та 68,5 % відповідно), ніж у чоловіків (23,9 та 31,5 % відповідно), то гомозиготний генотип C/C частіше виявлявся у чоловіків (72,7 %), ніж у жінок (27,3 %). Ці розбіжності мали великий ступінь значущості ($\chi^2 = 19,4$; $p = 6,2e-05$). Отже, встановлено, що генотип ризику C/C був притаманний переважно чоловікам.

У даному дослідженні не було встановлено залежності розвитку макулярного набряку від генотипу поліморфізму rs2010963 гена VEGFA ($p = 0,26$).

Наявність проліферативної ДР (ДПР) була притаманна більшою мірою носіям генотипу ризику C/C — 45,4 % порівняно з носіями генотипу G/G (20,6 %) та G/C (39,3 %), що мало статистичну значущість ($\chi^2 = 9,52$; $p = 0,01$). Неоваскуляризація диска зорового нерва (ДЗН) майже не відрізнялася при гомозиготних генотипах та була частішою у носіїв гетерозиготного генотипу — 29,2 %, проти 8,7 та 9,1 % при генотипах G/G та C/C, відповідно ($\chi^2 = 14,32$; $p = 7,8e-04$). Гемофтальм частіше зустрічався при генотипах G/C (21,4 %) та C/C (27,3 %) проти генотипу G/G (8,7%), що було статистично значимим ($\chi^2 = 7,52$; $p = 0,02$). Неоваскуляризація в іншому місці та у склоподібне тіло суттєво не залежали від наявності того чи іншого генотипу ($p = 0,13$ та $p = 0,07$ відповідно).

Отже, генотип поліморфізму rs2010963 гена VEGFA впливав на рівень глікемії та VEGFA у ВОР, які були максимальними за наявності генотипу ризику C/C. Крім того, цей генотип був більшою мірою притаманний чоловікам, обумовлював розвиток ДПР і наявність гемофтальму. Гетерозиготний генотип G/C частіше траплявся при наявності неоваскуляризації ДЗН.

Таблиця 2. Вплив генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGFA на якісні показники

Показники		n (f, %)			χ^2	p
		G/G, n = 92	G/C, n = 89	C/C, n = 22		
Стать	Ч	22 (23,9)	28 (31,5)	16 (72,7)	19,36	6,2e-05
	Ж	70 (76,1)	61 (68,5)	6 (27,3)		
Макулярний набряк	Ні (0)	42 (45,6)	40 (44,9)	14 (63,6)	2,65	0,26
	Так (1)	50 (54,3)	49 (55,1)	8 (36,4)		
Наявність ДПР	Ні (0)	73 (79,3)	54 (60,7)	12 (54,5)	9,52	0,01
	Так (1)	19 (20,6)	35 (39,3)	10 (45,4)		
Неоваскуляризація ДЗН	Ні (0)	84 (91,3)	63 (70,8)	20 (90,9)	14,32	7,8e-04
	Так (1)	8 (8,7)	26 (29,2)	2 (9,1)		
Неоваскуляризація в іншому місці	Ні (0)	75 (81,5)	64 (71,9)	14 (63,6)	4,08	0,13
	Так (1)	17 (18,5)	25 (28,1)	8 (36,4)		
Гемофтальм	Ні (0)	84 (91,3)	70 (78,6)	16 (72,7)	7,52	0,02
	Так (1)	8 (8,7)	19 (21,4)	6 (27,3)		
Неоваскуляризація у склоподібне тіло	Ні (0)	88 (95,6)	79 (88,8)	18 (81,8)	5,30	0,07
	Так (1)	4 (4,4)	10 (11,2)	4 (18,2)		

Примітки: n — число спостережень; f — частота у %, відповідна n; χ^2 — критерій ксі-квадрат Pearson із поправкою Yetes; p — статистична значущість відмінностей (прийнята при $p < 0,05$).

Як свідчили дані, наведені у табл. 3, вік хворих і тривалість ЦД за наявності різних генотипів поліморфізму rs699947 гена VEGFA не відрізнялися ($p = 0,31$ та $p = 0,07$ відповідно).

Необхідно відзначити, що тривалість ЦД у носіїв мінорної гомозиготи А/А була найменшою — в обох випадках до одного року. Опосередковано це могло підтверджувати наявність протективного ефекту цього генотипу, що було виявлено раніше.

Показники вуглеводного обміну — глюкоза крові та рівень HbA1c у носіїв різних генотипів поліморфізму rs699947 гена VEGF суттєво не відрізнялися ($p = 0,54$ та $p = 0,33$ відповідно). З офтальмологічних показників МГЗК була вищою у носіїв проєктивного генотипу А/А ($\chi^2 = 6,27$; $p = 0,04$), тоді як ЦОС —

був нижчим за інші генотипи ($\chi^2 = 5,83$; $p = 0,005$). Необхідно зважати на те, що таких хворих було тільки двоє, а ЦОС при генотипах С/С та С/А суттєво не відрізнялися: відповідно 6,9 мм³ ($Q_1-Q_{III} = 6,4-8,2$) та 7,0 мм³ ($Q_1-Q_{III} = 6,1-7,8$).

Найсильніший вплив поліморфізму rs699947 гена VEGFA спостерігався на рівень у ВОР VEGFA ($\chi^2 = 33,0$; $p = 3,5E-13$), який зазнавав максимального показника у носіїв предкового генотипу ризику С/С — був у 3,4 раза вищий за носіїв мінорного генотипу А/А та у 1,8 раза — за носіїв гетерозиготного генотипу С/А.

Аналіз впливу поліморфізму rs699947 гена VEGFA на якісні показники наведено у табл. 4. Було з'ясовано, що генотип не мав значущого впливу на стать, наяв-

Таблиця 3. Вплив генотипів поліморфізму rs699947 гена VEGFA на кількісні показники

Показники	Me (Q _I -Q _{III})			H	p
	C/C, n = 47	C/A, n = 154	A/A, n = 2		
Вік, роки	65,0 (60,0-69,0)	66,0 (61,0-74,0)	68,5 (68,0-69,0)	2,34	0,31
Тривалість ЦД, роки	8,0 (3,0-13,0)	7,0 (4,0-11,0)	1,0 (1,0-1,0)	5,33	0,07
Глюкоза крові, ммоль/л	8,1 (7,0-9,6)	8,2 (6,5-10,2)	6,8 (6,7-6,8)	1,21	0,54
HbA1c, %	8,3 (7,4-9,0)	7,7 (6,8-8,8)	8,9 (8,9-9,0)	2,15	0,33
МГЗК, од.	0,5 (0,1-0,8)	0,6 (0,3-0,9)	0,9 (0,9-0,9)	6,27	0,04
ВОТ, мм рт.ст.	17,0 (15,0-19,0)	17,0 (15,0-19,0)	17,0 (16,0-18,0)	0,37	0,83
ЦТС, мкм	275,0 (249,0-363,0)	267,5 (234,0-350,0)	223,0 (221,0-225,0)	2,97	0,22
ЦОС, мм ³	6,9 (6,4-8,2)	7,0 (6,1-7,8)	5,2 (5,1-5,2)	5,83	0,05
VEGFA, пг/мл	1524,0 (820,0-1809,0)	824,5 (627,0-984,0)	445,5 (440,0-451,0)	32,98	3,5E-13

Примітки: n — число спостережень; Me — медіана; Q_I і Q_{III} — 1-й і 3-й квартилі вибірок даних відповідно; H — критерій Kruskal — Wallis ANOVA by ranks; p — статистична значущість відмінностей порівняно з нульовою гіпотезою (прийнята при $p < 0,05$).

Таблиця 4. Вплив генотипів поліморфізму rs699947 гена VEGFA на якісні показники

Показники		n (f, %)			χ^2	p
		C/C, n = 47	C/A, n = 154	A/A, n = 2		
Стать	Ч	20 (42,5)	46 (29,9)	0 (0,0)	3,61	0,16
	Ж	27 (57,5)	108 (71,1)	2 (100,0)		
Макулярний набряк	Ні (0)	20 (42,6)	74 (48,0)	2 (100,0)	2,69	0,26
	Так (1)	27 (57,4)	80 (52,0)	0 (0,0)		
Наявність ДПР	Ні (0)	26 (55,3)	111 (72,1)	2 (100,0)	5,61	0,06
	Так (1)	21 (44,7)	43 (27,9)	0 (0,0)		
Неоваскуляризація ДЗН	Ні (0)	35 (74,5)	130 (84,4)	2 (100,0)	2,88	0,24
	Так (1)	12 (25,5)	24 (15,6)	0 (0,0)		
Неоваскуляризація в іншому місці	Ні (0)	34 (72,3)	117 (76,0)	2 (100,0)	0,92	0,63
	Так (1)	13 (27,7)	37 (24,0)	0 (0,0)		
Гемофтальм	Ні (0)	34 (72,3)	134 (87,0)	2 (100,0)	6,07	0,04
	Так (1)	13 (27,7)	20 (13,0)	0 (0,0)		
Неоваскуляризація в склоподібне тіло	Ні (0)	43 (91,5)	140 (90,9)	2 (100,0)	0,21	0,90
	Так (1)	4 (8,5)	14 (9,1)	0 (0,0)		

Примітки: n — число спостережень; f — частота у %, відповідна n; χ^2 — критерій ксі-квадрат Pearson із поправкою Yates; p — статистична значущість відмінностей (прийнята при $p < 0,05$).

ність макулярного набряку та ДПР ($p = 0,16$, $p = 0,26$ та $p = 0,06$ відповідно). З офтальмологічних показників значущі розбіжності розподілу пацієнтів були відмічені тільки для гемофтальму, який частіше був виявлений при наявності предкового генотипу ризику С/С (27,7%), ніж при наявності гетерозиготного генотипу С/А (13,0 %; $\chi^2 = 6,07$; $p = 0,04$). Для інших показників неоваскуляризація суттєвої різниці у розподілі генотипів виявлено не було ($p > 0,05$).

З метою підвищення надійності оцінки впливу генотипів rs2010963 і rs699947 гена VEGFA на кількісні й якісні показники хворих на ДР в умовах розподілу даних, відмінних від нормального, було застосовано регресійні моделі з класу узагальнених лінійних моделей.

Аналіз, заснований на їх використанні, менш критичний до параметрів нормальності й однорідності дисперсії варіаційних рядів. При виконанні аналізу як залежні змінні використано якісні та кількісні дані пацієнтів із ДР. Як незалежні змінні, вплив яких було піддано оцінці, — відповідні індикаторні значення генотипів VEGFA після понад-параметризованих перетворень. Результати аналізу наведено у табл. 5.

Регресійний аналіз показав наявність статистично значущого впливу поліморфізму rs2010963 гена VEGFA на рівень у ВОР VEGFA ($\chi^2 = 216,0$; $p = < 0,001$), на стать ($\chi^2 = 21,0$; $p = 2,3E-05$), наявність ДПР ($\chi^2 = 7,6$; $p = 0,02$) та неоваскуляризацію ДЗН ($\chi^2 = 8,39$; $p = 0,01$). Решта показників не мали значущого впливу, що в цілому збігається з результатами, наведеними у табл. 1 і 2. Виняток — показники рівня глюкози у крові та розподілу за генотипами пацієнтів із гемофтальмом; для цих показників у регресійному аналізі зв'язок із генотипами поліморфізму rs2010963 гена VEGFA не підтвердився.

Для поліморфізму rs699947 регресійний аналіз показав наявність статистично значущого впливу на такі показники: МГЗК ($\chi^2 = 33,0$; $p = 3,5E-13$), ЦТС ($\chi^2 = 7,4$; $p = 0,01$), рівень у ВОР VEGFA ($\chi^2 = 73,2$; $p = 1,1E-16$), а також наявність ДПР ($\chi^2 = 6,0$; $p = 0,01$) та гемофтальму ($\chi^2 = 6,5$; $p = 0,04$). При цьому, як свідчили дані, наведені у табл. 3, розбіжності значень ЦТС за генотипами не набували статистичної значущості ($p = 0,22$), але результати регресійного аналізу підтвердили наявність впливу генотипів на цей показник. Дані, наведені у табл. 4, також не підтвердили значущості розбіжностей за генотипом кількості пацієнтів із ДПР ($p = 0,06$), але результати регресійного аналізу показали наявність впливу генотипів і на цей показник.

Обговорення

Отримані нами результати збігаються з даними праць F.V. Vailati et al. щодо збільшення у пацієнтів, які не мали ЦД, очних або ретинальних захворювань, експресії гена VEGFA за умов наявності генотипу, що містив алель С (С/С або G/C) поліморфізму rs2010963 [17]. Тобто ці генотипи обумовлювали більшу експресію гена VEGFA, тоді як у наших дослідженнях — більший вміст VEGFA у ВОР.

Дослідження С.Ф. Chen et al. у хворих на ДР виявило більшу частоту генотипів ризику G/C та С/С поліморфізму rs2010963 порівняно з хворими на ЦД 2-го типу без ретинопатії ($p = 0,0205$), крім того, збільшення експресії гена VEGFA у 1,6–2 рази та вірогідно вищий рівень VEGFA за умов наявності алелі С [18].

Аналогічні результати отримані й дослідниками [19], які з'ясували збільшений рівень VEGFA у сироватці крові при ДР, ніж у контролі, що було більше виражено у носіїв генотипу С/С rs2010963.

Таблиця 5. Вплив генотипів поліморфізмів rs2010963 і rs699947 гена VEGFA на кількісні й якісні показники (за даними регресійного аналізу)

Показники	rs2010963		rs699947	
	W	p	W	p
Вік, роки	0,40	0,84	1,32	0,25
Тривалість діабету, роки	3,76	0,15	0,33	0,57
Глюкоза крові, ммоль/л	1,14	0,56	0,19	0,66
HbA1c, %	1,17	0,56	1,59	0,21
МГЗК, од.	0,44	0,80	6,01	0,01
ВОТ, мм рт.ст.	2,63	0,27	0,37	0,54
ЦТС, мкм	1,73	0,42	7,39	0,01
ЦОС, мм ³	1,61	0,45	1,38	0,74
VEGFA, пг/мл	216,04	< 0,001	73,24	1,1E-16
Стать	21,01	2,3E-05	3,42	0,06
Макулярний набряк	1,88	0,39	1,02	0,31
Наявність ДПР	7,61	0,02	6,04	0,01
Неоваскуляризація ДЗН	8,39	0,01	3,08	0,08
Неоваскуляризація в іншому місці	3,96	0,14	0,47	0,49
Гемофтальм	4,97	0,08	6,52	0,04
Неоваскуляризація в склоподібне тіло	3,91	0,14	2,5e-05	0,99

Примітки: W — критерій Wald; p — статистична значущість відмінностей порівняно з нульовою гіпотезою (прийнята при $p < 0,05$).

Найбільш сильний вплив поліморфізму rs699947 гена VEGFA було відзначено стосовно показника у ВОР VEGFA ($\chi^2 = 33,0$; $p = 3,5E-13$), який був максимальним у носіїв предкового генотипу ризику С/С — у 3,4 раза вищим за носіїв мінорного генотипу А/А та у 1,8 раза — за носіїв гетерозиготного генотипу С/А.

Аналогічні результати отримано у дослідженні Х. Fan et al. (2014), яке показало у хворих на ДР збільшення рівня VEGFA у сироватці крові, що було виражено більшою мірою у носіїв генотипу С/С, ніж генотипу С/А поліморфізму rs699947 [19].

Висновки

1. Доведений вплив поліморфізму rs2010963 на рівень у ВОР VEGFA (максимальний рівень мав генотип ризику С/С) та зв'язок зі статтю (генотип ризику С/С частіше траплявся у чоловіків, ніж у жінок — 3 : 1), наявністю ДПР (найчастіше була визначена за наявності генотипу ризику С/С: 45,4 %) та неоваскуляризацією ДЗН (найчастіше була визначена за наявності гетерозиготи G/C: 21,4 %). Отже, патогенетичний вплив генотипу ризику С/С цього поліморфізму частіше визначався у чоловіків, реалізувався завдяки високому рівню у ВОР VEGFA та проявлявся максимальною частотою ДПР.

2. Для поліморфізму rs699947 був доведений вплив генотипу на МГЗК (мінімальна гострота зору була наявна при генотипі С/С), ЦТС (максимальний показник — при генотипі С/С), рівень у ВОР VEGFA (максимальний рівень — при генотипі С/С), а також наявність ДПР та гемофтальму (найчастіше були визначені за наявності генотипу С/С, відповідно 44,7 та 27,7 %). Отже, патогенетичний вплив генотипу ризику С/С цього поліморфізму також реалізувався завдяки високому рівню у ВОР VEGFA, призводив до зниження гостроти зору, потовщення сітківки та проявлявся максимальною частотою ДПР і гемофтальму.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

References

1. Komisarenko YuI. Correction by vitamin D3 of disturbed metabolism in patients with diabetes mellitus types 1 and 2. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2014;86(1):111-116. (in Ukrainian).
2. Tron'ko MD, Chernobrov AD. Epidemiology of diabetes mellitus in Ukraine. *Zdorov'ja Ukraïny*. 2005;18(127):15. (in Ukrainian).
3. Vlasenko MV. Diabetes mellitus: diagnostics and monitoring. *Liky Ukraïny*. 2013;9-10:17-18. (in Ukrainian).
4. Dedov II, Smirnova OM. Diabetic retinopathy; current problems. *Sakharnyj diabet*. 2008;3:4-7. (in Russian).

5. Pankiv VI. Diabetes mellitus: diagnostic criteria, etiology and pathogenesis. *Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal*. 2013;8:53-64. (in Ukrainian).

6. Balashevich LI, Brzheskii VV, Izmailov AC, authors. Balashevich LI, editor. *Glaznye proiavleniia diabeta [Eye displays of diabetes mellitus]*. Saint-Petersburg: SPMAPE; 2004. 382 p. (in Russian).

7. Wu CM, Wu AM, Young BK, Wu DJ, Margo CF, Greenberg PB. An appraisal of clinical practice guidelines for diabetic retinopathy. *Am J Med Qual*. 2016 Jul;31(4):370-5. doi: 10.1177/1062860615574863.

8. Agarwal A, Soliman MK, Sepah YJ, Do DV, Nguyen QD. Diabetic retinopathy: variations in patient therapeutic outcomes and pharmacogenomics. *Pharmgenomics Pers Med*. 2014;7:399-409. doi: 10.2147/PGPM.S52821.

9. Schulkin AV, Kolesnikov AV, Barenina OI, Nikiforov AA. Genetic markers of diabetic retinopathy. *Fundamental research*. 2014;4(2):411-414 (in Russian).

10. Grassi MA, Tikhomirov A, Ramalingam S, Below JE, Cox NJ, Nicolae DL. Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy. *Hum Mol Genet*. 2011 Jun 15;20(12):2472-81. doi: 10.1093/hmg/ddr121.

11. Han L, Zhang L, Xing W, et al. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies. *J Diabetes Res*. 2014;2014:805801. doi: 10.1155/2014/805801.

12. Chun MY, Hwang HS, Cho HY, et al. Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with nonproliferative and proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jul;95(7):3547-51. doi: 10.1210/jc.2009-2719.

13. Qiu M, Xiong W, Liao H, Li F. VEGF-634G>C polymorphism and diabetic retinopathy risk: a meta-analysis. *Gene*. 2013 Apr 15;518(2):310-5. doi: 10.1016/j.gene.2013.01.018.

14. Xie XJ, Yang YM, Jiang JK, Lu YQ. Association between the vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms and diabetic retinopathy risk: a meta-analysis. *J Diabetes*. 2017 Aug;9(8):738-753. doi: 10.1111/1753-0407.12480.

15. Prišćáková P, Minárik G, Repiská V. Candidate gene studies of diabetic retinopathy in human. *Mol Biol Rep*. 2016 Dec;43(12):1327-1345. doi: 10.1007/s11033-016-4075-y.

16. Lu Y, Ge Y, Shi Y, Yin J, Huang Z. Two polymorphisms (rs699947, rs2010963) in the VEGFA gene and diabetic retinopathy: an updated meta-analysis. *BMC Ophthalmol*. 2013 Oct 16;13:56. doi: 10.1186/1471-2415-13-56.

17. Vailati FB, Crispim D, Sortica DA, Souza BM, Brondani LA, Canani LH. The C allele of -634G/C polymorphism in the VEGFA gene is associated with increased VEGFA gene expression in human retinal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Sep 21;53(10):6411-5. doi: 10.1167/iovs.12-9727.

18. Chen CF, Liou SW, Wu HH, et al. Regulatory SNPs alter the gene expression of diabetic retinopathy associated secretory factors. *Int J Med Sci*. 2016 Sep 12;13(9):717-23. doi: 10.7150/ijms.16345.

19. Fan X, Wu Q, Li Y, et al. Association of polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and its serum levels with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(4):651-7. PMID: 24534217.

Отримано 15.10.2017 ■

Гудзь А.С.¹, Зяблицев С.В.², Захаревич Г.Е.¹

¹ Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов, Украина

² Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Влияние полиморфизмов rs2010963 и rs699947 гена VEGFA на клинические и лабораторные показатели при диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2-го типа

Резюме. Актуальность. Ключевым фактором развития неоваскуляризации при диабетической ретинопатии (ДР) у больных сахарным диабетом 2-го типа (СД-2) является васкулоэндотелиальный фактор роста (VEGF). На важную роль генетических полиморфизмов гена VEGFA указывает ряд исследований и проведенные метаанализы, которые показали наличие ассоциации с ДР, особенно с ее пролиферативным вариантом (ДПР), что варьирует в разных популяциях. **Цель.** Определение влияния полиморфных генотипов rs2010963 и rs699947 гена VEGFA на клинические и лабораторные показатели при ДР у больных СД-2 украинской популяции. **Материалы и методы.** В исследование было включено 302 больных СД-2 с ДР. Диагноз устанавливали согласно Международной клинической классификации Американской академии офтальмологии (2003). Контрольную группу составили 98 человек, у которых не было СД-2 и ДР, а также других офтальмологических заболеваний. Все пациенты были прооперированы по поводу катаракты. Во внутриглазной жидкости (ВГЖ), которую собирали при операции, методом иммуноферментного анализа определено содержание VEGFA. Анализ полиморфных ДНК-локусов гена VEGFA: rs2010963 и rs699947 проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием унифицированных тест-систем TaqMan

Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США). **Результаты.** Анализ результатов исследования показал, что полиморфизм rs2010963 имел влияние на уровень в ВОР VEGFA (максимум — при генотипе риска C/C). Этот полиморфизм был связан с полом (генотип C/C чаще встречался у мужчин, чем у женщин — 3 : 1) с наличием ДПР (чаще у носителей генотипа C/C: 45,4 %) и неоваскуляризацией диска зрительного нерва (чаще у носителей гетерозиготы G/C: 21,4 %). Полиморфизм rs699947 влиял на остроту зрения (минимальная — у носителей генотипа C/C), толщину сетчатки (максимальный показатель — при генотипе C/C), уровень в ВГЖ VEGFA (максимальный — при генотипе C/C), а также наличие ДПР и гемофтальма (чаще — при генотипе C/C, соответственно: 44,7 и 27,7 %). **Выводы.** Генотип риска C/C полиморфизма rs2010963 чаще выявлялся у мужчин, его патогенетическое влияние реализовалось благодаря высокому уровню в ВГЖ VEGFA и проявлялось максимальной частотой ДПР. Патогенетическое влияние генотипа риска C/C полиморфизма rs699947 также реализовалось благодаря высокому уровню в ВГЖ VEGFA, приводило к снижению остроты зрения, утолщению сетчатки и проявлялось максимальной частотой ДПР и гемофтальма.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия; полиморфизм гена VEGFA; rs2010963; rs699947

A.S. Gudz¹, S.V. Ziablitsev², G.E. Zaharevich¹

¹ Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

² Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Influence of VEGFA gene polymorphisms rs2010963 and rs699947 on clinical and laboratory indicators in diabetic retinopathy among patients with type 2 diabetes mellitus

Abstract. Background. A key factor of neovascularization development in diabetic retinopathy (DR) among patients with type 2 diabetes mellitus (DM) is vascular endothelial growth factor A (VEGFA). The important role of genetic polymorphisms of the VEGFA gene indicates a number of studies and meta-analyses, that have shown their association with DR, especially with its proliferative variant, which varies in different populations. Accordingly, the purpose of this work was to find out the influence of the polymorphic genotypes rs2010963 and rs699947 of the VEGFA gene on clinical and laboratory parameters of DR in DM patients from Ukrainian population. **Materials and methods.** The study involved 302 patients with type 2 diabetes mellitus and DR. Diagnosis was established according to the international clinical classification adopted by the American Academy of Ophthalmology (2003). The control group consisted of 98 people who did not have DM and DR, as well as other ophthalmic diseases. All patients were operated on cataract. In the intraocular fluid collected during the surgery, the VEGFA content was determined by the immunoassay method. Analysis of the polymorphic DNA loci of the VEGFA gene: rs2010963 and rs699947 was performed in a real time polymerase chain reaction using TaqMan Mutation Detection Assays (Thermo Fisher Scientific, USA). **Results.** An analysis of the study results showed that rs2010963 polymorphism had an effect on the

intraocular fluid VEGFA level (maximum — under the C/C risk genotype). This polymorphism was related to the sex (the genotype C/C was more common in men than in women: 3 : 1), the presence of proliferative DR (most often was determined by the presence of the genotype C/C: 45.4 %) and neovascularization of the optic disc (most often determined by the presence of heterozygotes G/C: 21.4 %). Polymorphism rs699947 had an effect on the visual acuity (the minimum was available in the genotype C/C), the thickness of the retina (the maximum value — in the genotype C/C), the content of VEGFA in intraocular fluid (maximum level — in the genotype C/C), as well as the presence of proliferative DR and hemophthalm (most often determined by the presence of the genotype C/C, respectively: 44.7 and 27.7 %). **Conclusions.** The pathogenetic effect of the risk of genotype C/C rs2010963 was more often detected in men, realized due to the high level of VEGFA in intraocular fluid and manifested by the maximum incidence of proliferative DR. The pathogenetic effect of the genotype C/C rs699947 risk has also been realized due to the high intraocular VEGFA level, resulting in decreased visual acuity and retinal thickening and manifested as the maximum rate of proliferative DR and hemophthalm.

Keywords: diabetic retinopathy; VEGFA gene polymorphism; rs2010963; rs699947