

## ПОЛІМОРФНІ ВАРІАНТИ ГЕНА VEGF rs6921438 та rs2010963 ПРИ ДІАБЕТИЧНІЙ РЕТИНОПАТІЇ

С. О. Риков<sup>1</sup>, А. С. Гудзь<sup>2</sup>, Г. Є. Захаревич<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України  
– м. Київ, Україна

<sup>2</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України  
– м. Львів, Україна

**Мета дослідження:** виявлення значущості генетичних поліморфізмів гена VEGF – rs2010963 та rs6921438 при діабетичній ретинопатії.

**Матеріали та методи.** У 39 пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу та діабетичною ретинопатією визначали поліморфні варіанти гена VEGF методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

**Результати та їх обговорення.** За умов наявності «дикого» генотипу G/G поліморфізму rs2010963 гена VEGF суттєво частіше зустрічався макулярний набряк – 88,2±7,8% проти 11,8±7,8% за наявності генотипів G/C і C/C ( $p_{\text{Fet}}=0,04$ ). Цьому відповідали статистично значимо більші центральна товщина (у 1,2 раза;  $p=0,001$ ) та об'єм сітківки (у 1,1 раза;  $p=0,007$ ). У носіїв «дикого» генотипу G/G поліморфізму rs2010963 гена VEGF неоваскуляризація диску зорового нерва майже не зустрічалася: 5,9±5,7% проти 94,1±5,7% за наявності генотипів G/C і C/C ( $p_{\text{Fet}}=0,01$ ).

**Висновок.** Мінорна алель А поліморфізму rs6921438 гена VEGF сприяла більшому рівню глікемії у хворих на цукровий діабет 2 типу з діабетичною ретинопатією.

**Ключові слова:** цукровий діабет 2 типу, діабетична ретинопатія, поліморфізм генів VEGF, rs2010963, rs6921438.

Вперше діабетична ретинопатія (ДР) у хворих на цукровий діабет (ЦД) була описана MacKenzie у 1879 році, але, не зважаючи на більш ніж 100-річну історію, як і раніше залишається однією з основних причин сліпоти діабетиків [4, 12, 13]. За даними статистичних досліджень, на непроліферативну ретинопатію страждають близько 93 млн. хворих на ЦД, хворих з проліферативною формою ДР майже 17 млн., а з діабетичним макулярним набряком – 21 млн. [1]. Серед ускладнень ЦД ДР є одним з найбільш несприятливих, оскільки призводить до сліпоти та інвалідизації хворих [2, 3, 5, 6, 8]. Факторами ризику розвитку ДР є гіперглікемія, гіпертензія, гіперліпідемія [9, 11]. Але сучасними дослідженнями показано, що розвиток ДР залежить не тільки від рівня та тривалості гіперглікемії, але й від генетичних чинників, оскільки навіть при строгому глікемічному контролі спостерігаються ретинальні ушкодження у певної частини пацієнтів з ЦД 2 типу [12].

Показано, що ДР розвивається внаслідок дисбалансу між інгібіторами та індукторами ангіогенезу, а провідна роль в цьому процесі належить васкулоендотеліальному фактору росту судин (VEGF), експресія якого активується такими факторами, як ішемія, гіперглікемія, окислювальний стрес [7, 10, 14].

**Метою** дослідження було виявлення значущості генетичних поліморфізмів гена VEGF – rs2010963 та rs6921438 при діабетичній ретинопатії.

**Матеріали та методи.** В дане дослідження були включені 39 пацієнтів з ЦД 2 типу та з ДР, яких було прооперовано з приводу катаракти. Оперативне лікування хворих проводили на базі Київської міської клінічної офтальмологічної лікарні «Центр мікрохірургії ока» та клінічних баз Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Серед пацієнтів було 13 (33,3%) чоловіків та 26 (66,7%) жінок. Вік склав від 27 до 76 років, у середньому 61,4±1,8 років.

Поліморфні варіанти гена VEGF визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу з використанням реактивів TaqMan®SNP Genotyping Assay, Life-technologies (США) на аналізаторі DTlite (Росія). Визначали частоту розподілу алелей і генотипів та їхній зв'язок з клінічними, інструментальними та лабораторними показниками: тривалість ЦД, проліферативна або непроліферативна форми ДР, наявність або відсутність макулярного набряку, неоваскуляризації сітківки та скловидного тіла, гемофтальма; рівнями глікемії та глікованого гемоглобіну; максимальної гостроти зору з корекцією, величиною внутріш-

ньоочного тиску. Методом оптичної когерентної томографії (ОКТ) визначали центральну товщину та об'єм сітківки (використовували апарат «Stratus» фірми Carl Zeiss, Німеччина).

Аналіз даних проводився з використанням статистичного пакета MedCalc v.15.11.0 (MedCalc Software bvba, 1993–2015 р.р.).

**Результати та їх обговорення.** Загалом обстежена група хворих характеризувалася такими показниками. Діагноз діабетичної проліферативної ретинопатії було встановлено у 21 хворого (53,8%), діагноз діабетичної непроліферативної ретинопатії – у 18 (46,2%). Компенсований перебіг ЦД мав місце у 12 хворих (30,8%), декомпенсований – у 27 (69,2%). Тривалість діабету складала від 2 до 37 років, в середньому –  $11,1 \pm 1,3$  року; більшість хворих мала тривалість захворювання до 10 років – 23 особи (59,0%). У даній групі хворих, за даними кореляційного аналізу, вік не був пов'язаний із тривалістю захворювання ( $r=0,23$ ;  $p>0,05$ ). Рівень глюкози у крові натще склав  $8,99 \pm 1,27$  ммоль/л; глікованого гемоглобіну –  $8,2 \pm 0,8\%$ .

Максимальна гострота зору з корекцією складала  $0,51 \pm 0,05$  Од; внутрішньоочний тиск –  $20,4 \pm 2,9$  мм рт.ст. Макулярний набряк був наявний у 27 хворих (69,2%); при цьому центральна товщина та об'єм сітківки були істотно вищими (табл. 1), ніж без нього, відповідно у 1,5 раза ( $p=0,001$ ) та у 1,2 раза ( $p=0,007$ ). Показники товщини та об'єму сітківки були тісно пов'язані між собою:  $r=+0,89$  ( $p<0,05$ ) за наявності макулярного набряку та  $r=+0,81$  ( $p<0,05$ ) за його відсутністю.

Неоваскуляризація зорового нерва була відмічена у 11 хворих (28,2%), неоваскуляризація в інших регіонах сітківки – у 15 (38,5%), а неоваскуляризація у скловидне тіло – у 4 (10,2%). Гемофтальм був наявний у 10 хворих (25,6%).

При аналізі розподілу генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGF у хворих було встановлено, що генотип G/G був присутній у 17 (43,6%), генотип G/C – у 21 (53,8%) та генотип C/C – у 1 хворого (2,6%). Відповідно алель G зустрічалася у 55 хворих (70,5%), тоді як алель C – у 23 хворих (29,5%).

Згідно даних MAF Source: 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/node/506>) «дикою» алеллю цього поліморфізму є алель G, мінорною – алель C, загальна частота якої в популяції складає  $C=0,3261/1633$ . Виходячи з малої кількості мінорних гомозигот, для подальшого аналізу було обрано домінуючу модель, яка передбачає, що вплив на пенетрантність проявляється для гетерозигот та гомозигот за наявністю алелі, що повертає (mm+Mm vs MM) у нашому випадку генотипи (C/C + G/C) проти G/G (табл. 2 та 3).

За умов наявності «дикого» генотипу G/G макулярний набряк виявлявся суттєво частіше –  $88,2 \pm 7,8\%$  проти  $11,8 \pm 7,8\%$  за наявності генотипів C/C+G/C ( $p_{\text{Fet}}=0,04$ ). При наявності генотипів з мінорною алеллю розподіл був майже рівним ( $54,5 \pm 10,6\%$  проти  $45,5 \pm 10,6\%$ ). Неоваскуляризація диску зорового нерва, навпаки, у носіїв «дикого» генотипу G/G майже не зустрічалася (тільки в одному випадку з 17):  $5,9 \pm 5,7\%$  проти  $94,1 \pm 5,7\%$  ( $p_{\text{Fet}}=0,01$ ). Розподіл цієї ознаки за умов наявності

Таблиця 1

### Показники оптичної когерентної томографії у хворих за наявністю або відсутністю макулярного набряку

Наявність макулярного набряку	Кількість спостережень	Центральна товщина сітківки, $\bar{X} \pm t$ (мкм)	Центральний об'єм сітківки, $\bar{X} \pm t$ (мм <sup>3</sup> )
наявний	12 (30,8 %)	$349 \pm 20$	$8,02 \pm 0,29$
відсутній	27 (69,2 %)	$237 \pm 9$	$6,63 \pm 0,28$
p*		0,001	0,007

Примітка: \* – різниця між даними статистично значима (критерій Стьюдента);  $p<0,05$ .

Таблиця 2

### Наявність якісних ознак ДР у носіїв різних генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGF

Показник		Генотип		Рівень значущості різниць, p
		C/C+G/C, абс. (% $\pm$ m%) (n=22)	G/G абс. (% $\pm$ m%) (n=17)	
макулярний набряк	наявний	12 ( $54,5 \pm 10,6$ )	15 ( $88,2 \pm 7,8$ )	0,04*
	немає	10 ( $45,5 \pm 10,6$ )	2 ( $11,8 \pm 7,8$ )	
неоваскуляризація диску зорового нерва	наявна	10 ( $45,5 \pm 10,6$ )	1 ( $5,9 \pm 5,7$ )	0,01*
	немає	12 ( $54,5 \pm 10,6$ )	16 ( $94,1 \pm 5,7$ )	

Примітка: \* – різниця між генотипами статистично значима (точний критерій Фішера);  $p<0,05$ .

генотипів з мінорною алеллю також був майже рівним.

Центральна товщина та об'єм сітківки були статистично значимо більшими за умов наявності «дикої» гомозиготи G/G, відповідно, у 1,2 раза та у 1,1 раза ( $p=0,01$  у обох випадках).

Для всіх інших показників статистично значущі відмінності не виявлені, що диктує необхідність подальших досліджень із збільшенням кількості спостережень та набором даних у контрольній групі, до якої необхідно залучити пацієнтів, яких було прооперовано з приводу ретинопатії недіабетичного генезу.

Таким чином, за умов наявності «дикого» генотипу G/G поліморфізму rs2010963 гена VEGF у хворих на ДР суттєво частіше зустрічався макулярний набряк, чому відповідали статистично значимо більші центральна товщина та об'єм сітківки. При цьому неоваскуляризація диску зорового нерва майже не зустрічалася.

При аналізі розподілу генотипів поліморфізму rs6921438 гена VEGF у хворих було встановлено, що генотип C/C виявлявся у 8 (20,5%), генотип C/A – у 31 (79,5%), тоді як мінорна гомозигота A/A не була виявлена у жодного хворого. Відповідно алель C зустрічалася у 47 хворих (60,3%), тоді як алель A – у 31 хворого (39,7%).

Згідно даних MAF Source: 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/node/506>) «дикою» алеллю цього поліморфізму є алель C, мінорною – алель A, загальна частота якої в популяції складає  $A=0,4365/2186$ . Виходячи з відсутності мінорних гомозигот, для подальшого аналізу, як і в попередньому випадку, була обрана домінантна модель: у даному випадку – генотип C/C проти C/A.

З усіх показників, які були проаналізовані, статистично значущим за умов наявності різних генотипів у групі хворих, що була досліджена, відрізнявся тільки рівень глюкози у крові натще (табл. 4).

Як було встановлено, за наявності гетерозиготи поліморфізму C/A, рівень глюкози у крові натще був вищий у 1,2 раза ( $p=0,01$ ), ніж за наявності «дикої» гомозиготи. Тобто, можна було стверджувати, що мінорна алель A поліморфізму rs6921438 гена VEGF сприяла більшому рівню глікемії у хворих на ЦД 2 типу з ДР. Інших статистично значущих відмінностей по цьому поліморфізму виявлено не було, що також диктувало необхідність подальшого збору матеріалу та набору контрольної групи.

Таким чином, аналіз попередніх результатів дослідження показав, що за умов наявності «дикого» генотипу G/G поліморфізму rs2010963 гена VEGF у хворих на ДР суттєво частіше зустрічався макулярний набряк, чому відповідали статистично значимо більші центральна товщина та об'єм сітківки. При цьому неоваскуляризація диска зорового нерва майже не зустрічалася. Мінорна алель A поліморфізму rs6921438 гена VEGF сприяла більшому рівню глікемії у хворих на ЦД 2 типу з ДР.

#### Література

1. Ангиогенез при пролиферативной диабетической ретинопатии: перспективы анти-VEGF-терапии / В. И. Коненков, В. В. Климонтов, В. В. Черных, Н. В. Тян // Офтальмохирургия. – 2013. – № 4. – С. 111–115.
2. Величко П. Б. Современные методические подходы к лечению диабетической ретинопатии / П. Б. Величко, Э. М. Османов // Вестник ТГУ. – 2013. – Т. 18, вып. 6. – С. 3248–3249.

Таблиця 3

#### Показники оптичної когерентної томографії у носіїв різних генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGF

Показник	Генотип		Рівень значущості різниць, $p$
	C/C+G/C, $\bar{X} \pm m$ ( $n=22$ )	G/G, $\bar{X} \pm m$ ( $n=17$ )	
центральна товщина сітківки, мкм	289±21	348±26	0,01*
центральний об'єм сітківки, мм <sup>3</sup>	7,26±0,32	8,02±0,36	0,01*

Примітка: \* – різниця між генотипами статистично значима (критерій W-Вілкоксона);  $p<0,05$ .

Таблиця 4

#### Рівень глюкози у крові у носіїв різних генотипів поліморфізму rs6921438 гена VEGF

Показник	Генотип		Рівень значущості різниць, $p$
	C/C, $\bar{X} \pm m$ ( $n=8$ )	C/A, $\bar{X} \pm m$ ( $n=31$ )	
глюкоза крові, ммоль/л	7,90±0,42	9,28±0,43	0,01*

Примітка: \* – різниця між генотипами статистично значима (критерій Ст'юдента);  $p<0,05$ .

3. Веселовська З.Ф. Ретинопротекторні властивості норваску в профілактиці розвитку діабетичного макулярного набряку / З. Ф. Веселовська, Н. М. Веселовська, Л. М. Литвинчук // Клініч. фармація. – 2007. – 11, № 2. – С. 34–35.
4. Дедов И.И. Диабетическая ретинопатия: современные проблемы / И. И. Дедов, О. М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2008. – № 3. – С. 4–8.
5. Метревели Д. С. Распространенность ретинопатии среди больных сахарным диабетом / Д. С. Метревели, М. З. Сулханишвили, М. З. Маргвелашвили // Проблемы эндокринологии. – 2006. – Т. 52, № 4. – С. 6–8.
6. Науменко В.А. Интегральная система ранней диагностики непролиферативной диабетической ретинопатии / В. А. Науменко // Одеський медичний журнал. – 2010. – № 3 (119). – С. 58–61.
7. Сарыгина О. И. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста в патогенезе диабетической ретинопатии / О. И. Сарыгина, В. В. Нероев, О. А. Левкина // Вестник офтальмологии. – 2009. – № 2. – С. 58–60.
8. Чумаева Е. А. Офтальмологические последствия сахарного диабета: социально-гигиенические и клинические аспекты // Вестник офтальмологии. — 2003. — № 5. — С. 43–44.
9. Abouammoh M. A. Ranibizumab injection for diabetic macular edema: meta-analysis of systemic safety and systematic review / M. A. Abouammoh // Can. j. ophthalmol. – 2013. – Vol. 48, № 4. – P. 317–323.
10. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients / M. Buraczynska, P. Ksiazek, I. Baranowicz-Gaszczyk, L. Jozwiak // Nephrology dialysis transplantation. – 2007. – Vol. 22, № 3. – P. 827–832.
11. Bloomgarden Z. Screening for and managing diabetic retinopathy: current approaches / Z. Bloomgarden // Am. j. health syst. pharm. – 2007. – Vol. 64, № 17 (suppl. 12). – P. s8–s14.
12. Standards of medical care in diabetes — 2012 / American Diabetes Association // Diabetes care. – 2012. – Vol. 35 (suppl. 1). – P. s11–s63.
13. The evidence for automated grading in diabetic retinopathy screening / A. D. Fleming, S. Philip, K. A. Goatman [et al.] // Curr. diabetes rev. – 2011. – Vol. 7, № 4. – P. 246–252.
14. What is the contribution of two genetic variants regulating VEGF levels to type 2 diabetes risk and to microvascular complications? / A. Bonnefond, P. J. Saulnier, M. G. Stathopoulou [et al.] // PloS one. – 2013. – Vol. 8, № 2. – e55921.

### ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА VEGF rs6921438 и rs2010963 ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

*С. А. Рыков, А. С. Гудзь, Г. Е. Захаревич*

Целью исследования явилось выявление значения генетических полиморфизмов гена VEGF – rs2010963 и rs6921438 при диабетической ретинопатии. У 39 пациентов с сахарным диабетом 2 типа и диабетической ретинопатией определяли полиморфные варианты гена VEGF методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. При наличии «дикого» генотипа G/G полиморфизма rs2010963 гена VEGF значительно чаще встречался макулярный отек – 88,2±7,8% против 11,8±7,8% при генотипах G/C и C/C ( $p_{\text{Fet}}=0,04$ ). Этому соответствовали статистически значимо большие центральная толщина (в 1,2 раза;  $p=0,001$ ) и объем сетчатки (в 1,1 раза;  $p=0,007$ ). У носителей «дикого» генотипа G/G полиморфизма rs2010963 гена VEGF неоваскуляризация диска зрительного нерва почти не встречалась: 5,9±5,7% против 94,1±5,7% при наличии генотипов G/C и C/C ( $p_{\text{Fet}}=0,01$ ). Минорная аллель А полиморфизма rs6921438 гена VEGF способствовала большему уровню гликемии у больных сахарным диабетом 2 типа с диабетической ретинопатией.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа, диабетическая ретинопатия, полиморфизм гена VEGF, rs2010963, rs6921438.

### GENE VEGF POLYMORPHISMS rs6921438 and rs2010963 AT THE DIABETIC RETINOPATHY

*S.A. Rykov<sup>1</sup>, A.S. Gudz<sup>2</sup>, G.Y. Zakharevych<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> National Medical Academy of Postgraduate Education named after P.L. Shupyk of the Ministry of Public Health of Ukraine  
*Kyiv, Ukraine*

<sup>2</sup> Lviv National Medical University named after Danylo Halyskiy of the Ministry of Public Health of Ukraine  
*Lviv, Ukraine*

An objective of this research was detection the gene VEGF polymorphisms – rs2010963 and rs6921438 at the diabetic retinopathy. 39 patients with diabetes mellitus 2 types and with diabetic retinopathy were de-

terminated the genetic polymorphisms by polymerase chain reaction method in real time. In the presence the “wild” genotype G/G of rs2010963 polymorphism macular edema was determined considerably more often – at 88,2±7,8% against 11,8±7,8% at genotypes of G/C and C/C ( $p_{Fet}=0,04$ ). Corresponded to it statistically significantly big were the central thickness (by 1,2 times;  $p=0,001$ ) and retina volume (by 1,1 times;  $p=0,007$ ). At carriers of the “wild” genotype G/G of rs2010963 polymorphism the neovascularisation of the optic nerve disk almost didn't meet: 5,9±5,7% against 94,1±5,7% in the presence of G/C and C/C genotypes ( $p_{Fet}=0,01$ ). The minor allele A of VEGF gene polymorphism rs6921438 promoted the bigger level of glycemia at patients with diabetes 2 types with a diabetic retinopathy.

**Key words:** *diabetes mellitus 2 types, diabetic retinopathy, VEGF gene polymorphisms, rs2010963, rs6921438.*

Рецензент – Пенішкевич Я.І., д.мед.н., професор

Стаття надійшла до редакції 01.09.2015 р.

УДК 616-07:[617.736:616.379-008.64]

## УСОВЕРШЕНСТВОВАНЫЙ АЛГОРИТМ АНАЛИЗА СНИМКОВ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ МАКУЛЯРНОЙ ОБЛАСТИ СЕТЧАТКИ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОМ МАКУЛЯРНОМ ОТЕКЕ

С. А. Рыков<sup>1</sup>, С. Ю. Могилевский<sup>1</sup>, О. Г. Пархоменко<sup>2</sup>, С. А. Сук<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика МЗ Украины,

<sup>2</sup> Киевская городская клиническая офтальмологическая больница «Центр микрохирургии глаза» МЗ Украины  
– г. Киев, Украина

В роботі представлений удосконалений алгоритм аналізу знімків спектральної оптичної когерентної томографії макулярної ділянки сітківки для оцінки ступеня вираженості діабетичної макулопатії за міжнародною шкалою важкості діабетичного макулярного набряку. Методика аналізу легка в опануванні та може використовуватись для скринінгу діабетичного макулярного набряку.

**Ключові слова:** *діабетичний макулярний набряк, оптична когерентна томографія.*

Сахарный диабет (СД) является глобальной проблемой современной медицины, что связано с его распространенностью, тенденцией к увеличению числа больных практически во всех странах мира и высокой инвалидизацией вследствие его осложнений [1-2].

Макулярный отек может быть первым симптомом диабетической ретинопатии (ДРП) или возникать на любой стадии ее развития. По данным литературы, диабетический макулярный отек (ДМО) развивается у 42 % больных СД 1-го типа и более чем у 80% больных СД 2-го типа через 15 лет после начала заболевания. С каждым годом число больных с ДМО увеличивается на 5-10% [3-5]. Частота диабетического макулярного отека повышается прямо пропорционально продолжительности заболевания сахарным диабетом и тяжести диабетического поражения [6]. Оптическая когерентная томография (ОКТ) при ДМО используется с целью скрининга отека, его количественной оценки и установления соотноше-

ния с фовеальной областью [7-8]. Таким образом обоснована необходимость в систематизации и сопоставлении изменений ОКТ картины макулярной области сетчатки с международной градацией степени тяжести ДМО.

**Целью работы** было усовершенствование алгоритма анализа снимков оптической когерентной томографии макулярной области сетчатки при диабетическом макулярном отеке.

**Материал и методы.** В исследование были включены 82 пациента (125 глаз) с сахарным диабетом и диабетической ретинопатией различной степени тяжести и офтальмоскопическими признаками диабетической макулопатии. Всем пациентам, кроме общеклинических обследований и определения лучшей скорректированной остроты зрения, измерения внутриглазного давления, непрямой офтальмоскопии с фундус линзой, были проведены специализированные исследования: спектральная ОКТ высокого разрешения (аксиальная разрешающая способность прибора – 5 мкм)