

Гудзь А.С.¹, Захаревич Г.Є.¹, Панченко Ю.О.²,
Могилевський С.Ю.², Бушуєва О.В.¹, Петренко О.В.²

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

² Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, м. Київ, Україна

Зв'язок поліморфізмів rs2010963 та rs699947 гена VEGFA з розвитком та прогресуванням діабетичної ретинопатії в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу: заключні результати

Резюме. Серед ускладнень цукрового діабету діабетична ретинопатія (ДР) — одне з найбільш несприятливих, оскільки призводить до сліпоти та інвалідизації пацієнтів. **Мета:** вивчити зв'язок поліморфізмів rs2010963 та rs699947 гена VEGFA з розвитком та прогресуванням діабетичної ретинопатії в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу (ЦД2Т). Під наглядом перебували 302 пацієнти. Із них у 98 не були виявлені ні ЦД2Т, ні ДР. Вони були включені до контрольної групи. У 204 пацієнтів було встановлено ЦД2Т із різною стадією ДР (група дослідження). Усім пацієнтам виконували загальноприйнятні офтальмологічні дослідження. Проводили дослідження поліморфних ДНК-локусів гена VEGFA rs2010963 та rs699947 методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США). Поліморфізм rs2010963 пов'язаний із ДР; гетерозигота G/C збільшувала в 1,6 рази шанси розвитку ДР, мінорна гомозигота — в 1,9 рази; предкова гомозигота G/G зменшувала шанси розвитку ДР в 1,8 рази. Стратифікація за стадіями ДР показала, що розподіл генотипів та алелей rs2010963 мав статистичне значення тільки для пацієнтів із проліферативною ДР (ПДР). Поліморфізм rs699947 пов'язаний із ДР; предкова гомозигота C/C збільшувала у 2,2 рази шанси розвитку ДР, тоді як гетерозигота та мінорна гомозигота такі шанси зменшували відповідно в 1,5 та 5,6 рази. Стратифікація за стадіями ДР встановила, що більша частота предкової гомозиготи C/C мала статистичне значення лише за ПДР ($p = 0,001$). Гомозигота C/C асоціювалася з ПДР та у 3,8 рази підвищувала ризик її розвитку порівняно з іншими генотипами. Гаплотип G/C—C/C утричі збільшував шанси розвитку ДР при ЦД2Т. При ЦД2Т наявність гаплотипу G/G—C/A у 2–3 рази зменшувала шанси розвитку ПДР; наявність гаплотипу G/C—C/C — збільшувала ризик у 4–10 разів; гаплотип C/C—C/A був маркером ПДР ($p < 0,05$). Відзначене зниження коефіцієнта нерівноважного зчеплення алелей LD при ПДР ($D' = 0,42$) порівняно з контрольною групою ($D' = 0,71$). У результаті проведеного дослідження був установлений зв'язок поліморфізмів rs2010963 та rs699947 гена VEGFA з розвитком та прогресуванням ДР при ЦД2Т.

Ключові слова: діабетична ретинопатія; цукровий діабет 2-го типу; поліморфізм rs2010963 гена VEGFA; поліморфізм rs699947 гена VEGFA; розвиток, прогресування

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) — мультифакторне захворювання, у генезі якого генетичні чинники займають фундаментальне місце [1–4]. За даними Міжнародної федерації діабету (IDF), у 2014 році налічувалося 387 мільйонів хворих на ЦД, при цьому поширеність патології з роками лише збільшується, незважаючи на

численні програми [5–7]. Очікуваний приріст хворих на ЦД до 2035 року, за прогнозами, становитиме ще 205 мільйонів нових випадків. Останніми роками спостерігається збільшення захворюваності на ЦД в осіб молодого віку, а у 2014 році вперше до звіту IDF внесені дані про поширеність гіперглікемії під час вагітності та її вплив на новонароджених [6]. В Україні кількість

пацієнтів із ЦД збільшується щороку, незважаючи на те, що з травня 1999 р. в країні запроваджено державну програму «Цукровий діабет» [8–10]. При проведенні скринінгових досліджень ЦД щорічно виявляються 3–4 пацієнти з уперше діагнованим ЦД на кожного зареєстрованого раніше [10–12]. До факторів ризику розвитку ЦД відносять ожиріння, артеріальну гіпертензію, хвороби печінки та підшлункової залози, сімейний анамнез [13–17]. В Україні у загальній структурі ЦД понад 80 % становить інсуліннезалежний тип [10, 18]. До основних ускладнень ЦД відносять ураження судин нирок, ока та його придаткового апарату, нижніх кінцівок [19–24].

Серед ускладнень ЦД діабетична ретинопатія (ДР) — одне з найбільш несприятливих, оскільки призводить до сліпоти та інвалідації пацієнтів [25–27]. Факторами ризику ДР є гіперглікемія, артеріальна гіпертензія, гіперліпідемія, а також стаж ЦД [28–31]. Також сучасні дослідження показали, що розвиток ДР залежить не тільки від рівня та тривалості гіперглікемії, а й від генетичних факторів, оскільки навіть при суворому глікемічному контролі спостерігаються ретинальні ушкодження у певної частки пацієнтів із ЦД 2-го типу (ЦД2Т) [32–35]. При ДР порушення мікроциркуляції сітківки призводить до її ішемії [36, 37], що внаслідок викиду васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) спричинює неоваскуляризацію сітківки та перехід не-проліферативної ДР (НПДР) у проліферативну ДР (ПДР), крововиливи з тіла в сітківку, що, у свою чергу, призводить до раптової втрати зору та відшарування сітківки [38]. До індукторів утворення VEGF відносять гіпоксію, гіперглікемію, окиснювальний стрес [39, 40].

Одним із напрямів профілактики прогресування ДР та її ускладнень є інтравітреальна анти-VEGF-терапія. Блокатори VEGF розглядають як золотий стандарт лікування захворювань, пов'язаних із неоваскуляризацією сітківки. На жаль, незважаючи на наявний арсенал анти-VEGF-препаратів, їх ефект у низки пацієнтів не завжди позитивний. Низка досліджень показала, що внаслідок етнічних відмінностей поліморфізмів гена VEGF спостерігаються різні ефекти анти-VEGF-терапії.

У зв'язку з цим персоналізована терапія ДР на підставі дослідження поліморфізмів VEGF є новим курсом, який спрямований на досягнення максимального терапевтичного ефекту в пацієнтів шляхом визначення генотипових та фенотипових факторів, які можуть зробити свій внесок в ефективність терапії.

Проведені нами ранні дослідження встановили роль поліморфних варіантів гена альдозоредуктази rs759853 і rs9640883 у розвитку та прогресуванні ДР при ЦД 2-го типу [41, 42].

Ідентифікація генетичних маркерів та розробка відповідно спрямованих фармацевтичних препаратів визначають перспективність персоналізованої медицини в майбутньому.

Мета: вивчити зв'язок поліморфізмів rs2010963 та rs699947 гена VEGFA з розвитком та прогресуванням діабетичної ретинопатії в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу.

Матеріали та методи

Дослідження мало проспективний характер і було одномоментним, тип обсерваційного спостереження «випадок — контроль», рівень доказовості С (Ів).

Дослідження проводили з дотриманням положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні засади проведення медичних досліджень за участю людини як суб'єкта» (прийнятої на 18-й Генеральній Асамблеї ВМА, Гельсінкі, Фінляндія, червень 1964 р., з наступними доповненнями, включаючи версію 2013 р.) та Наказом МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Критерії включення до групи дослідження: пацієнти з ДР та ЦД2Т із достатнім діаметром зіниці та достатньою прозорістю оптичних середовищ для виконання оптичної когерентної томографії сітківки. Критерії виключення із групи дослідження: наявність іншої патології органа зору недіабетичного характеру; наявність відомих на момент дослідження інших системних захворювань, крім ЦД2Т.

Критерії включення до групи контролю: пацієнти без ЦД2Т та супутньої офтальмопатології; без відомих на момент дослідження системних захворювань. Ці пацієнти звернулися до клініки для підбору окулярів або були направлені суміжними фахівцями для дослідження очного дна.

Критерії виключення з групи контролю: наявність іншої патології органа зору; наявність цукрового діабету та інших відомих на момент дослідження системних захворювань.

Стадію ДР визначали за класифікацією Американської академії офтальмології (2003).

Під наглядом перебували 302 пацієнти. Із них у 98 не були встановлені ні ЦД2Т, ні ДР. Вони були включені до контрольної групи. У 204 пацієнтів було встановлено ЦД2Т із різною стадією ДР (група дослідження). Пацієнти контрольної та досліджуваної груп не відрізнялися у розподілі за статтю та віком.

Згідно з робочою класифікацією, пацієнти з ДР та ЦД2Т були розподілені на три групи:

- 1-ша — 76 пацієнтів з I стадією ДР (без змін на очному дні — no retinopathy);
- 2-га — 64 пацієнти із встановленою НПДР;
- 3-тя — 64 пацієнти із встановленою ПДР.

Гендерний розподіл (жінок та чоловіків відповідно) у групах був таким: у контрольній групі — 59 (60,2 ± 4,9 %) та 39 (39,8 ± 4,9 %) відповідно; у 1-й групі — 54 (71,1 ± 5,2 %) та 22 (28,9 ± 5,2 %); у 2-й групі — 40 (62,5 ± 6,1 %) та 24 (37,5 ± 6,1 %); у 3-й групі — 44 (68,8 ± 5,8 %) та 20 (31,2 ± 5,8 %) відповідно. Відмінності між групами були статистично значущими ($p = 0,53$). Як видно з цього розподілу, кількість жінок у кожній групі корелювала з числом чоловіків як 2 : 1.

Середній вік у групах становив: 69,6 ± 1,1 року у контрольній групі; 67,6 ± 0,8 року у 1-й групі; 67,8 ± 1,1 року у 2-й групі; 61,1 ± 0,9 року у 3-й групі. При перевірці з використанням критерію Крускала — Уолліса було встановлено, що на рівні значущості $p < 0,001$ пацієнти 3-ї групи були молодшими за інших. Цей факт,

на наш погляд, вказував на швидше прогресування у цих пацієнтів ПДР та ЦД2Т.

Усім пацієнтам виконували загальноприйняті офтальмологічні дослідження: візометрію; рефрактометрію; тонометрію; гоніоскопію; біомікроскопію; фотографування очного дна у 7 полях згідно з протоколами дослідження ETDRS; оптичну когерентну томографію (протокол Cross-Line та EMM5: вимірювання найменшої товщини та об'єму сітківки в проєкції фовеа в режимі Cross Line).

Одержання зразків крові виконували шляхом пункції ліктьової вени та забору 2,5 мл крові через одноразовий шприц (Hemoplast, Etalon+, Україна) об'ємом 5,0 мл з голкою діаметром 23 G та подальшим випусканням у контейнер (Vacuette K3E K3EDTA, Greiner bio-one, Австрія) об'ємом 3,0 мл. Відразу після забору біологічного матеріалу проводилося його маркування, упаковка в пластиковий контейнер, на внутрішній поверхні якого фіксували стікер, що містить необхідні паспортні та офтальмологічні дані пацієнта, на основі яких створювали електронну базу даних у програмі Excel 2007 (Microsoft Corporation, США) із присвоєнням індивідуального порядкового номера.

Пластиковий контейнер негайно розміщували в морозильній камері, де він зберігався до етапу транспортування та дослідження. Аналіз поліморфних ДНК-локусів гена VEGFA rs2010963 та rs699947 здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (США). На першому етапі дослідження проводили виділення геномної ДНК із венозної крові. Для цього контейнери з кров'ю розморожували та ідентифікували згідно з написами на стікерах. Виділення ДНК проводили за допомогою стандартних реактивів PureLink® Genomic DNA Kit For purification of genomic DNA, виробник INVITROGEN (США). Набір PureLink® дозволяв швидко та ефективно очищати ДНК, також він призначений для очищення та виділення геномної ДНК із клітин та тканин ссавців, щурячих та мишачих хвостів, зразків крові, мазків, бактеріальних препаратів, фіксованих формаліном або парафіном тканин тощо. У процесі виконання методики проводили підготовку лізатів клітин крові та очищення ДНК від лізованих речовин шляхом центрифугування за допомогою змінних колонок із силіцієвою мембраною (silica-based membrane), після чого ДНК знімали з сорбенту. Кількість ДНК становила від 5 до 25 мг на пробу, що було достатньо для подальшого проведення ПЛР. Аналіз поліморфних ДНК-локусів гена VEGFA rs2010963 та rs699947 здійснювали з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США). Згідно з технологією виконання аналізу, на першому етапі ПЛР проводили інкубацію ДНК-матриці із системою праймерів, які фланкують ділянки ДНК аналізованих генів у присутності ДНК-полімерази в автоматичному ампліфікаторі Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) за наступною програмою: первинна денатурація при 93 °C протягом 2 хв, після якої випливали 30 циклів,

що склалися з денатурації при 96 °C протягом 10 с, відпалу праймерів при 62 °C протягом 15 с, елонгації при 72 °C протягом 20 с.

Отримані дані опрацьовували за допомогою програми Sequence Detection Software 2.0. Поліморфізм rs2010963 гена VEGFA має локалізацію Chr.6:43770613 on Build GRCh38. Сиквенс ділянки аналізується — CGCGCGGGCGTGCAGCAGCGAAAG[C/G]GACAGGGGCAAAGTGAGTGACCTGC. Цей поліморфізм є простою нуклеотидною заміною (трансверзією) G на C в інtronі гена VEGFA. Предковою алеллю є алель G, мінорною — алель C, загальна частота якої становить $A = 0,3261/1633$, за даними MAF Source: 1000 Genomes. Поліморфізм rs966647 гена VEGFA має локалізацію Chr.6:43768652 on GRCh38. Сиквенс ділянки аналізується — GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA[A/C]GATCTGGGTGGATAATCAGACTGAC. Цей поліморфізм є простою нуклеотидною заміною (трансверзією) C на A в інtronі гена VEGFA. Предковою алеллю є алель C, мінорною — алель A, загальна частота якої становить $A = 0,3245/1625$, за даними MAF Source: 1000 Genomes.

Для аналізу впливу чинників на кількісні змінні використовували регресійні моделі класу узагальнених лінійних моделей (GLZ). Аналіз, заснований на їх використанні, менш критичний до параметрів нормальності та однорідності дисперсії варіаційних рядів. У цьому категоріальні змінні піддавалися надпараметризованим перетворенням. Для аналізу впливу факторів на категоріальні змінні, пов'язані з ризиками розвитку патологічних процесів, були залучені методи побудови однофакторних та багатфакторних моделей логістичної регресії, при побудові яких був використаний метод максимальної правдоподібності. Вибір факторних ознак проводився на підставі аналізу β -коефіцієнтів предикторів регресії з використанням статистики Wald. Оцінку адекватності логістичних моделей виконували на основі аналізу кривих операційних характеристик (ROC), при цьому розраховували площу під ROC-кривою (AUC). Модель вважалася адекватною при статистично значущій відмінності величини AUC від 0,5. Для оцінки ступеня та спрямованості впливу факторних ознак на результуючу змінну розраховували показник відношення шансів (odds ratio, OR) та відповідний 95% довірчий інтервал (ДІ). Статистичний аналіз результатів клінічних досліджень проводили за допомогою пакета програм IBM SPSS Statistics v. 22 (IBM Inc., США) і Statistica 10 (StatSoft, Inc., США).

Результати та обговорення

При аналізі розподілу частот генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGFA порівняно з контролем у групах пацієнтів була відзначена тенденція до зменшення кількості носіїв предкового генотипу G/G ($p = 6,0 \cdot 10^{-4}$) та збільшення носіїв мінорного генотипу C/C ($p = 0,22$). Поліморфізм rs2010963 мав зв'язок із ДР ($\chi^2 = 6,34$; $p(\chi^2) = 0,04$). Гетерозигота G/C збільшувала в 1,6 раза шанси розвитку ДР (OR = 1,56, 95% ДІ 0,94–2,57), тоді як мінорна гомозигота такі шанси збільшувала в 1,9 раза (OR = 1,85, 95% ДІ 0,73–4,73). Предкова

гомозигота G/G зменшувала шанси розвитку ДР в 1,8 раза (OR = 0,54; 95% ДІ 0,33–0,89). При цьому мінорна алель С поліморфізму rs2010963 гена VEGFA мала зв'язок із ДР і в 1,6 раза збільшувала шанси її розвитку (OR = 1,64; 95% ДІ 1,11–2,43). Предкова алель G зменшувала такі шанси в 1,6 раза (OR = 0,61; 95% ДІ 0,41–0,90). Стратифікація за стадіями ДР дозволила встановити, що статистичне значення загальна тенденція розподілу генотипів та алелей поліморфізму rs2010963 гена VEGFA мала тільки для пацієнтів із ПДР, у яких сила зв'язку за показниками χ^2 і p була навіть більшою, ніж у загальній групі пацієнтів ($\chi^2 = 16,55$; $p(\chi^2) = 2,5 \text{ E-}0,4$ проти $\chi^2 = 6,34$; $p(\chi^2) = 0,04$; для алелей $\chi^2 = 15,60$; $p(\chi^2) = 1,0 \text{ E-}04$ проти $\chi^2 = 6,20$; $p(\chi^2) = 0,01$ відповідно). Крім того, тільки для ПДР була встановлена статистична значущість розподілу гетерозиготи G/C, яка виявлялася значно частіше при ПДР порівняно з контрольною групою ($p = 0,007$). Установлено, що саме зниження частоти предкової гомозиготи G/G та збільшення частоти гетерозиготи G/C було асоційоване з розвитком ПДР порівняно з НПДР. Зв'язок генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGFA та якісних показників поданий у табл. 1.

Для поліморфізму rs699947 було показано, що зі збільшенням тяжкості ДР знижується кількість носіїв гетерозиготного та гомозиготного мінорного генотипів (C/C та C/A) зі збільшенням кількості носіїв предкової генотипу (C/C). Між поліморфізмом rs699947 гена VEGFA нами було встановлено такий зв'язок із ДР ($\chi^2 = 9,53$; $p(\chi^2) = 0,01$): предкова гомозигота C/C збільшувала в 2,2 раза шанси розвитку ДР (OR = 2,21; 95% ДІ 1,11–4,38), тоді як гетерозигота та мінорна гомозигота такі шанси зменшували відповідно в 1,5 та в 5,6 раза (OR = 0,65; 95% ДІ 0,35–1,19, та OR = 0,18; 95% ДІ 0,04–0,97). Для поліморфізму rs699947 гена VEGFA стратифікація за стадіями ДР дозволила встановити, що велика

частота предкової гомозиготи, яка була встановлена у всіх пацієнтів із ДР, мала статистичне значення тільки для пацієнтів із ПДР. Тільки для ПДР нами було встановлено захисний вплив мінорної алелі А та запобіжний вплив генотипу А/А. Розподіл генотипів поліморфізму rs699947 гена VEGFA впливав на розвиток ПДР порівняно з НПДР: фактором ризику виникнення ПДР є наявність предкової гомозиготного генотипу C/C, тоді як фактором, який зменшує такий ризик, є гетерозиготний генотип C/A. Генотип мажорної алелі C/C асоціювався з ПДР і в 3,8 раза підвищував ризик її розвитку (OR = 3,75; 95% ДІ 1,70–8,31) порівняно з іншими генотипами. Також поліморфізм rs2010963 частіше зустрічався у чоловіків, ніж у жінок (3 : 1), асоціювався з наявністю ПДР та неоваскуляризацією ДЗН.

Гаплотип G/C–C/C утричі збільшував шанси розвитку ДР при ЦД2Т порівняно з пацієнтами, які не мали ЦД2Т (контрольна група). У пацієнтів із ДР та ЦД2Т наявність гаплотипу G/G–C/A у 2–3 рази зменшувала шанси розвитку ПДР, тоді як наявність гаплотипу G/C–C/C у 4–10 разів такий ризик збільшувала. Гаплотип C/C–C/A виявився маркером ПДР, оскільки зустрічався лише за умови цього стану ($p < 0,05$). Зв'язок генотипів поліморфізму rs699947 гена VEGFA та якісних показників поданий у табл. 2.

Також нами було відзначено зниження коефіцієнта нерівноважного зчеплення алелей LD у пацієнтів із ПДР порівняно з контрольною групою та іншими пацієнтами з ДР та ЦД2Т (1-ша та 2-га групи). Це вказувало на зниження ступеня нерівноважного зчеплення алельних гаплотипів rs2010963 і rs699947 при прогресуванні ДР і, особливо, за наявності ПДР. Такий факт міг відображати патогенетичну роль алельного гаплотипу C/C у розвитку саме ПДР при ЦД2Т та тенденцію до накопичення цього алельного гаплотипу у хворих в українській популяції.

Таблиця 1. Зв'язок генотипів поліморфізму rs2010963 гена VEGFA та якісних показників

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	6,2 E-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 ПДР	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	7,8 E-04
	Так (1)	8 (8,7)	26 (29,2)	2 (9,1)		
Наявність неоваскуляризації	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 в 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: тут і в табл. 2: n — кількість спостережень; f — частота у відсотках, відповідна n; χ^2 — критерій *хі-квадрат* *Pirson* із поправкою *Yates*; p — статистична значущість відмінностей (прийнята при $p < 0,05$).

Таблиця 2. Зв'язок генотипів поліморфізму rs699947 гена VEGFA та якісних показників

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 ПДР	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)		
Наявність неоваскуляризації	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)		

Висновки

1. Поліморфізм rs2010963 пов'язаний із ДР ($\chi^2 = 6,34$; $p(\chi^2) = 0,04$); гетерозигота G/C збільшувала в 1,6 раза шанси розвитку ДР (OR = 1,56; 95% ДІ 0,94–2,57), мінорна гомозигота — в 1,9 раза (OR = 1,85; 95% ДІ 0,73–4,73); предкова гомозигота G/G зменшувала шанси розвитку ДР в 1,8 раза (OR = 0,54; 95% ДІ 0,33–0,89). Стратифікація за стадіями ДР показала, що розподіл генотипів та алелей rs2010963 мав статистичне значення тільки для пацієнтів із ПДР (для генотипів $\chi^2 = 16,55$; $p(\chi^2) = 2,5 \text{ E-}0,4$; для алелей $\chi^2 = 15,60$; $p(\chi^2) = 1,0 \text{ E-}0,4$).

2. Поліморфізм rs699947 пов'язаний із ДР ($\chi^2 = 9,53$; $p(\chi^2) = 0,01$); предкова гомозигота C/C збільшувала у 2,2 раза шанси розвитку ДР (OR = 2,21; 95% ДІ 1,11–4,38), тоді як гетерозигота та мінорна гомозигота такі шанси зменшували відповідно в 1,5 та в 5,6 раза (OR = 0,65; 95% ДІ 0,35–1,19, та OR = 0,18; 95% ДІ 0,04–0,97). Стратифікація за стадіями ДР встановила, що більша частота предкової гомозиготи C/C мала статистичне значення лише за ПДР ($p = 0,001$). Гомозигота C/C асоціювалася з ПДР та в 3,8 раза підвищувала ризик її розвитку (OR = 3,75; 95% ДІ 1,70–8,31) порівняно з іншими генотипами.

3. Гаплотип G/C–C/C утричі збільшував шанси розвитку ДР при ЦД2Т порівняно з контрольною групою. У пацієнтів із ЦД2Т наявність гаплотипу G/G–C/A у 2–3 рази зменшувала шанси розвитку ПДР, тоді як наявність гаплотипу G/C–C/C у 4–10 разів такий ризик збільшувала; гаплотип C/C–C/A виявився маркером ПДР ($p < 0,05$). Було відмічено зниження коефіцієнта нерівноважного зчеплення алелей LD у пацієнтів із ПДР ($D' = 0,42$) порівняно з контрольною групою ($D' = 0,71$) та іншими пацієнтами з ЦД2Т ($D' = 1,00$).

Внесок авторів. Гудзь А.С. — ідея дослідження; Захаревич Г.Є. — проведення клінічних та молекулярно-генетичних досліджень, написання основних

положень дослідження; Панченко Ю.О. — контроль клінічних та молекулярно-генетичних досліджень; Могилевський С.Ю. — остаточне формулювання висновків дослідження; Бушусва О.В. — проведення клінічних та молекулярно-генетичних досліджень, написання основних положень дослідження; Петренко О.В. — остаточне формулювання висновків дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

Список літератури

1. Degtyarenko T.V., Bogdanova O.V. Vmest yadernih nukleotidiv u riznih populyaciyah limfoidnih klitin i stan imunoreaktivnosti organizmu u hvorih na diabetichni angiopatii ta retinopatii. Odes'kij med. zhurn. 2006. № 4 (96). S. 49–53. [in Ukrainian]
2. Scott L.J., Mohlke K.L., Bonnycastle L.L. et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. Science. 2007. P. 1142382.
3. Huang T., Qi Q., Zheng Y. et al. Genetic predisposition to central obesity and risk of type 2 diabetes: two independent cohort studies. Diabetes care. 2015. Vol. 38. № 7. P. 1306–1311.
4. Global Guideline for Type 2 Diabetes: recommendations for standard, comprehensive, and minimal care (IDF Clinical Guidelines Task Force). Diabet. Med. 2006. Vol. 23. P. 579–593.
5. Maslova O.V., Suncov Y.U.I. Epidemiologiya sahnogo diabetu i mikrososudistyh oslozhnenij. Saharnyj diabet. 2011. № 3 (52). S. 6–11. [in Russian]
6. Global Guideline for type 2 diabetes. The International Diabetes Federation. Brussels, 2012. 123 p.
7. Kapetanakis V.V., Rudnicka A.R., Liew G. et al. A study of whether automated Diabetic Retinopathy Image Assessment could replace manual grading steps in the English National Screening Programme. J. med. screen. 2015. Vol. 22. № 3. P. 112–118.
8. Komisarenko Y.U. I. Korekciya vitaminom D3 porushen' metabolichnih procesiv u pacientiv iz cukrovim diabetom 1-gota 2-go

tipiv. *Ukraïns'kij biokhimičnij zhurnal*. 2014. T. 86. № 1. S. 111-116. [in Ukrainian]

9. Gajdaev Yu.O., Moiseenko R.O., Zhdanova M.P. i dr. Stan endokrinologichnoï sluzhbi Ukraïni ta perspektivi rozvritku medichnoï dopomogi hvorim z endokrinnoy patologiyeyu. *Mezhdunarodnyj endokrinologicheskij zhurnal*. 2006. № 2 (4). S. 9-14. [in Ukrainian]

10. Tron'ko M.D., Chernobrov A.D. *Epidemiologiya cukrovogo diabetu v Ukraïni. Zdorov'ya Ukraïni*. 2005. № 18 (127). S. 15. [in Ukrainian]

11. Vlasenko M.V. *Cukrovij diabet: diagnostika i monitoring. Liki Ukraïni*. 2013. № 9-10. S. 17-18. [in Ukrainian]

12. Kadzharyan V.G., Kapshitar' N.I. *Novoe v lechenii saharnogo diabetu 2 tipa. Zaporozhskij medicinskij zhurnal*. 2014. № 1. S. 74-79. [in Russian]

13. Anciferov M. *Sovremennye standarty lecheniya bol'nyh saharnym diabetom 2 tipa (osnovnye položeniya issledovaniya UKPDS)*. *Vrach*. 2000. № 1. S. 6-8. [in Russian]

14. Neroev V.V., Kolchin A.A., Zueva M.V. i dr. *Asociacii narushenij funkcional'noj aktivnosti setchatki, metabolicheskikh i gemodinamicheskikh izmenenij u bol'nyh saharnym diabetom bez priznakov retinopatii*. *Rossijskij oftal'mologicheskij zhurnal*. 2013. T. 6. № 1. S. 20-25. [in Russian]

15. Kekhiopulo H.F. *Pokazniki sistem koagulyacii ta fibrinolizu, markeri zapalennya u hvorih na cukrovij diabet 2-go tipu z ozhirinnyam*. *Klinichna endokrinologiya ta endokrinna hirurgiya*. 2013. № 2. S. 15-20. [in Ukrainian]

16. Man'kovskij B.N. *Sovremennye principy terapii SD 2 tipa. Aktual'ni problemi endokrinologii: materialy 46-i nauk.-prakt. konf., Harkiv, 19-21 chervnya 2002 r.* S. 39-42. [in Russian]

17. Keymel S., Heinen Y., Balzer J. et al. *Characterization of macro- and microvascular function and structure in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2011. № 1(1). P. 68-75.

18. Bezdetko P.A., Gorbacheva E.V. *Epidemiologiya i chastota saharnogo diabetu i diabeticheskoy retinopatii*. *Mezhdunarodnyj endokrinologicheskij zhurnal*. 2006. № 4 (6). S. 76-80. [in Russian]

19. Dedov I.I., Shestakova M.V., Milen'kaya T.M. *Saharnyj diabet: retinopatiya, nefropatiya*. M.: Medicina, 2001. 175 s. [in Russian]

20. Pan'kiv V.I. *Cukrovij diabet: diagnostichni kriterii, etiologiya i patogenez*. *Mizhnarodnij endokrinologichnij zhurnal*. 2013. № 8. S. 53-64. [in Ukrainian]

21. Skripnik N.V., Grib V.A., Didushko O.M. *Osoblivosti patogenezu ta likuvannya diabetichnoï avtonomnoï nejropatii (oglyad literaturi)*. *Liki Ukraïni*. 2012. № 2. S. 6-14. [in Ukrainian]

22. Skrypnyk R.L. *Poshkodzhennya zorovogo nerva pri cukrovomu diabete (patogenez, klinika, diagnostika, likuvannya): avtoref. dis. na zdobuttya nauk. stup. kand. med. nauk : spec. 14.01.08 «Ochni hvorobi»*. Odesa, 2005. 37 s. [in Ukrainian]

23. Skrypnyk R.L., Skrypnychenko I.D., Dzyuba N.A. *Povyshenie effektivnosti lecheniya pacientov s diabeticheskoy retinopatiej*. *Oftal'mol. Vost. Evropa*. 2019. № 9 (2). S. 246-252. [in Russian]

24. Donnelly R., Emsly-Smith A.M., Gardner I.D., Morris A.D. *Vascular complications of diabetes*. *BMJ*. 2000. Vol. 15. № 320 (7241). P. 1062-1066.

25. Velichko P.B., Osmanov E.M. *Sovremennye metodicheskie podhody k lecheniyu diabeticheskoy retinopatii*. *Vestnik TGU*. 2013. T. 18. Vyp. 6. S. 3248-3249. [in Russian]

26. Naumenko V.A. *Integral'naya sistema rannej diagnostiki neproliferativnoj diabeticheskoy retinopatii*. *Odes'kij medichnij zhurnal*. 2010. № 3 (119). S. 58-61. [in Russian]

27. Pasechnikova N.V., Naumenko V.A., Zborovskaya A. i dr. *Sostoyanie gematoretinal'nogo bar'era pri diabeticheskoy retinopatii po dannym flyuorimetrii*. *Oftal'mol. zhurnal*. 2008. № 5. S. 4-7. [in Russian]

28. Bloomgarden Z. *Screening for and managing diabetic retinopathy: current approaches*. *Am. j. health syst. pharm.* 2007. Vol. 64. № 17 (suppl. 12). P. s8-s14.

29. Agarwal A., Soliman M.K., Sepah Y.J. et al. *Diabetic retinopathy: variations in patient therapeutic outcomes and pharmacogenomics*. *Pharmgenomics pers. med.* 2014. Vol. 7. P. 399-409.

30. Negre-Salvayre A., Salvayre R., Augé N. et al. *Hyperglycemia and glycation in diabetic complications*. *Antioxid. redox signal.* 2009. Vol. 11. № 12. P. 3071-3109.

31. Pérez-Escamilla R., Damio G., Chhabra J. et al. *Impact of a community health workers-led structured program on blood glucose control among latinos with type 2 diabetes: the DIALBEST trial*. *Diabetes care*. 2015. Vol. 38. № 2. P. 197-205.

32. Shchul'kin A.V., Kolesnikov A.V., Barenina O.I., Nikiforov A.A. *Geneticheskie markery razvitiya diabeticheskoy retinopatii*. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014. № 4-2. S. 411-414. [in Russian]

33. Hallman D.M., Boerwinkle E., Gonzalez V.H. et al. *A genome-wide linkage scan for diabetic retinopathy susceptibility genes in Mexican Americans with type 2 diabetes from Starr County, Texas*. *Diabetes*. 2007. Vol. 56. P. 1167-1173.

34. Cooke J.N., Ng M.C., Palmer N.D. et al. *Genetic risk assessment of type 2 diabetes-associated polymorphisms in African Americans*. *Diabetes care*. 2012. Vol. 35. № 2. P. 287-292.

35. Grassi M.A., Tikhomirov A., Ramalingam S.S. et al. *Genome-wide meta-analysis for severe diabetic retinopathy*. *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20. P. 2472-2481.

36. Lange C.A., Stavarakas P., Luhmann U.F. et al. *Intraocular oxygen distribution in advanced proliferative diabetic retinopathy*. *Am. J. Ophthalmol.* 2011. Vol. 152. № 3. P. 406-412.

37. Kempen J.H., O'Colmain B.J., Leske M.C. et al. *The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States*. *Arch. ophthalmol.* 2004. Vol. 122. № 4. P. 552-563.

38. Morello C. *Etiology and natural history of diabetic retinopathy: an overview*. *Am. j. health syst. pharm.* 2007. Vol. 64. № 17 (suppl. 12). s3-s7.

39. Sarygina O.I., Neroev V.V., Levkina O.A. *Rol' sosudistogo endotelial'nogo faktora rosta v patogeneze diabeticheskoy retinopatii*. *Vestnik oftal'mologii*. 2009. № 2. S. 58-60. [in Russian]

40. Buraczynska M., Ksiazek P., Baranowicz-Gaszczyk I., Jozwiak L. *Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients*. *Nephrology dialysis transplantation*. 2007. Vol. 22. № 3. P. 827-832.

41. Mogilevs'kij S.Yu., Bushueva O.V. *Rozpodil genotipiv ta aleliv polimorfizmiv rs759853 i rs9640883 gena AKR1B1 u hvorih na diabetichnu retinopatiyu, kataraktu i cukrovij diabet 2 tipu*. *Arhiv oftal'mologii Ukraïni: naukovopraktichnij medichnij zhurnal*. 2016. T. 4. № 2. S. 44-49. [in Ukrainian]

42. Mogilevs'kij S.Yu., Zyblicev S.V., Natrus L.V., Bushueva O.V. *Svyaz' polimorfizmiv rs759853 i rs9640883 gena AKR1B1 s kliniko-laboratornymi pokazatelyami pri diabeticheskoy retinopatii*. *Oftal'mologichnij zhurnal*. 2017. № 2. S. 3-7. [in Russian]

Отримано/Received 04.06.2022

Рецензовано/Revised 19.06.2022

Прийнято до друку/Accepted 02.07.2022 ■

A.S. Hudz¹, G.E. Zakharevych¹, Yu.O. Panchenko², S.Yu. Mogilevskyy², O.V. Bushueva¹, O.V. Petrenko²

¹ Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

² Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Association of rs2010963 and rs699947 polymorphisms of the VEGFA gene with the development and progression of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus: final results

Abstract. Among the complications of diabetes mellitus (DM), diabetic retinopathy (DR) is one of the most unfavorable, since it leads to blindness and disability of patients. Purpose: to study the relationship of rs2010963 and rs699947 polymorphisms of the VEGFA gene with the development and progression of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2T). Three hundred and two patients were under observation. Of these, 98 did not have DM2T or DR. They were included in the control group. Two hundred and four patients were diagnosed with DM2T with different stages of DR (study group). All patients underwent generally accepted ophthalmological examinations. Polymorphic DNA loci of the VEGFA rs2010963 and rs699947 gene were studied using real-time polymerase chain reaction and unified test systems TaqMan Mutation Detection Assays Thermo Fisher Scientific (USA). Polymorphism rs2010963 is associated with DR; homozygote G/C increased the risk of developing DR by 1.6 times, minor homozygote — by 1.9 times; ancestral homozygote G/G reduced the risk of developing DR by 1.8 times. Stratification by DR stages showed that the statistical value of the distribution of rs2010963 genotypes and alleles was evident only for patients with prolifera-

tive DR (PDR). Polymorphism rs699947 is associated with DR; ancestral homozygote C/C increased the risk of developing DR by 2.2 times, while heterozygote and minor homozygote reduced such risks by 1.5 and 5.6 times, respectively. Stratification by stages of DR found that a high frequency of ancestral homozygote C/C was statistically significant only in case of PDR ($p = 0.001$). Homozygote C/C was associated with PDR and 3.8 times increased the risk of its development compared to other genotypes. G/C-C/C haplotype tripled the risk of developing DR in DM2T. In DM2T, the presence of G/G-C/A haplotype reduced the risk of developing PDR by 2–3 times; the presence of G/C-C/C haplotype 4–10 times increased this risk; C/C-C/A haplotype was a PDR marker ($p < 0.05$). There was a decrease in the coefficient of non-equilibrium adhesion of LD alleles in PDR ($D' = 0.42$) compared to the control group ($D' = 0.71$). The study established the association of rs2010963 and rs699947 polymorphisms of the VEGFA gene with the development and progression of DR in DM2T.

Keywords: diabetic retinopathy; type 2 diabetes mellitus; rs2010963 polymorphism of the VEGFA gene; rs699947 polymorphism of the VEGFA gene; development; progression