

ISSN 2309-8147 (print), ISSN 2311-2999 (online)

Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика  
Громадська організація  
«Асоціація дитячих офтальмологів та оптометристів України»  
Громадська організація  
«Асоціація фахівців з офтальмопластики та очного протезування»

# АРХІВ ОФТАЛЬМОЛОГІЇ УКРАЇНИ



  
**ZASLAVSKY**<sup>®</sup>  
Publishing house

[www.mif-ua.com](http://www.mif-ua.com)

Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика

Громадська організація  
«Асоціація дитячих офтальмологів та оптометристів України»

Громадська організація  
«Асоціація фахівців з офтальмопластики та очного протезування»

**АРХІВ  
ОФТАЛЬМОЛОГІЇ  
УКРАЇНИ**

**Архів офтальмології України**  
**Archive Of Ukrainian Ophthalmology**  
**Arhiv oftal' mologії Ukraїni**

**Спеціалізований рецензований науково-практичний журнал**

**Засновано у лютому 2013 року**

**Періодичність виходу: до 4 разів на рік**

**Том 12, № 1, 2024**

Включений в наукометричні і спеціалізовані бази даних НБУ ім. В.І. Вернадського, «Україніка наукова», «Наукова періодика України», CrossRef, WorldCat, Google Scholar, BASE, OUCI.

Журнал реферується Інститутом проблем реєстрації інформації НАН України



mif.ua.com



Open Journal System

## Значення поліморфізму rs4986790 гена *TLR4* у розвитку діабетичної ретинопатії та діабетичного макулярного набряку при цукровому діабеті 2-го типу

**Резюме. Актуальність.** Основу пошкодження сітківки при цукровому діабеті 2-го типу (ЦД2) становить розвиток хронічного метаболічного запалення, пускова роль в активації якого належить Toll-подібним рецепторам (TLR). Хронічна гіперглікемія збільшує експресію TLR, що активує прозапальні шляхи діабетогенного пошкодження сітківки. **Мета:** встановити значення поліморфізму rs4986790 (896A/G, Asp299Gly) гена *TLR4* для розвитку діабетичної ретинопатії (ДР) і діабетичного макулярного набряку (ДМН) при ЦД2. **Матеріали та методи.** Дослідження включало 81 пацієнта (81 око) із ЦД2, у яких за настановами Американської академії офтальмології (2002 рік) виявлені ДР і ДМН, контрольну групу становили 50 пацієнтів (50 очей) із ЦД2, нормалізованим вуглеводним обміном, ДР 0 (ретинопатія відсутня) і відсутністю ДМН. Генотипи rs4986790 визначали методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі із застосуванням ампліфікатора Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) і тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США). Для статистичних досліджень використано програмні пакети MedStat і MedCalc v.15.1 (MedCalc Software bvba). **Результати.** За умови ЦД2 поліморфізм rs4986790 гена *TLR4* мав зв'язок з розвитком ДР і ДМН за домінантною моделлю успадкування ( $p = 0,034$ ): ризик їх розвитку в носіїв генотипів A/G+G/G був утричі більшим (співвідношення шансів (СШ) = 3,09; 95% довірчий інтервал (ДІ) 1,16–8,20) порівняно з носіями генотипу A/A. При стратифікації за стадіями ДР і ступенем ДМН зв'язки зберігалися тільки для проліферативної ДР (для алелей  $p = 0,048$ ) і ДМН 3-го ступеня (для генотипів  $p = 0,017$ ; для алелей  $p < 0,001$ ). Аналіз зв'язку з фенотипом пацієнтів показав більші показники глікемії, вмісту глікованого гемоглобіну, центральної товщини й об'єму сітківки в носіїв гетерозиготи й мінорного генотипу G/G порівняно з носіями предкової гомозиготи A/A. Регресійний аналіз підтвердив отримані результати: ризик ДР і ДМН у пацієнтів з ЦД2, які були носіями генотипів A/G і G/G, був більшим ( $p = 0,024$ ) порівняно з носіями предкової гомозиготи A/A (СШ = 3,1; 95% ДІ 1,2–8,2). **Висновки.** Проведене дослідження показало ризикову роль поліморфізму rs4986790 гена *TLR4* у виникненні ДР і ДМН при ЦД2. **Ключові слова:** запалення; центральна товщина сітківки; об'єм сітківки; регресійний аналіз

### Вступ

Останнім часом цукровий діабет (ЦД) набуває характеру світової пандемії з прогнозом зростання кількості хворих до 463 млн осіб до 2045 року, серед яких частка пацієнтів із ЦД 2-го типу (ЦД2) буде становити до 95 % [1]. Найбільш частими очними ускладненнями ЦД2 і основною причиною сліпоты є діабетична ретинопатія (ДР) і діабетичний макулярний набряк (ДМН) [2].

Основу пошкодження сітківки при ЦД2 становить розвиток хронічного метаболічного запалення (метазапалення), пускова роль в активації якого належить Toll-подібним рецепторам (TLR), які здатні розпізнавати прозапальні патогени [3, 4]. Хронічна гіперглікемія збільшує експресію TLR4, що активує різні прозапальні шляхи діабетогенного комплексного пошкодження сітківки, що ведуть до розвитку ДР і ДМН [5].

Відомо, що генетична схильність є одним з факторів, що викликають очні ускладнення ЦД2 [6]. Шляхом біоінформаційного аналізу генів, що пов'язані з ангиогенезом на ранній стадії ДР, і побудови мережі білок-білкової взаємодії було ідентифіковано 10 генів-концентраторів, пов'язаних з неоваскуляризацією: *TLR4*, *TNF*, *VEGFA*, *PIK3CB*, *TGFB1*, *EDN1*, *MMP9*, *PDGFB*, *MMP2* і *THBS1* [7].

В іншому біоінформаційному аналізі було відібрано 13 генів-концентраторів, які були пов'язані з інфламасомним комплексом, продукцією бета-інтерлейкіну-1 і сигнальним шляхом NOD-подібного рецептора [8]. Серед них три гени (*TLR4*, *CASP3* і *GBP2*) були ключовими в опосередкованні клітинного піроптозу при ДР.

Вважається, що ДР щільно пов'язана з гетерозиготним генотипом гена *TLR4*, який сприяє розвитку ДР [9]. Певний дослідницький інтерес зосереджений на поліморфізмі rs4986790 гена *TLR4* (896A/G, Asp299Gly) [10]. Носії його мутантних генотипів A/A та A/G мали потрійний ризик розвитку нейропатії ( $p = 0,026$ ), артеріопатії нижніх кінцівок ( $p = 0,013$ ) та основних серцево-судинних захворювань ( $p = 0,017$ ).

Метааналіз, що включив 11 досліджень пацієнтів із ЦД2, проведених до 2020 року (4069 осіб з ЦД2 і мікросудинними ускладненнями і 1834 особи з ЦД2 без ускладнень) показав, що поліморфізм Asp299Gly гена *TLR4* підвищував ризик розвитку мікросудинних ускладнень при ЦД2 (домінантна модель — співвідношення шансів (СШ) = 1,52; 95% довірчий інтервал (ДІ) 1,10–2,09;  $p = 0,01$ ; аельна модель — СШ = 1,42; 95% ДІ 1,02–1,96;  $p = 0,04$ ), що особливо стосувалося європеїдної популяції (домінантна модель — СШ = 1,69) і ДР (домінантна модель — СШ = 1,81) [11].

У метааналізі, що включав 41 дослідження (23 250 випадків і 24 760 — контроль), було показано, що поліморфізм rs4986790 був пов'язаний з підвищеним ризиком ЦД2 в азіатів (A/G проти A/A — СШ = 1,23; 95% ДІ 1,01–1,50;  $p = 0,042$ ) [12]. Генотипування за поліморфізмом Asp299Gly гена *TLR4* пацієнтів з ЦД2 і ДР показало наявність чіткої асоціації (СШ = 1,88; 95% ДІ 0,93–3,79) [13]. В аналізі багатофакторної логістичної регресії аель G Asp299Gly була незалежним фактором ризику раннього початку ДР ( $p < 0,001$ ).

З іншого боку, існують протилежні дані, які показують протективну роль мутантних алелей Asp299Gly і Thr399Ile гена *TLR4* при ЦД2 [14].

**Мета роботи:** встановити значення поліморфізму rs4986790 (Asp299Gly) гена *TLR4* у розвитку діабетичної ретинопатії та діабетичного макулярного набряку при цукровому діабеті 2-го типу.

## Матеріали та методи

До дослідження залучено 131 пацієнта (131 око), серед яких 81 мали ЦД2, ДР і ДМН, а 50 — тільки ЦД2 (контрольна група). Вік пацієнтів становив від 53 до 85 років, у середньому  $65,70 \pm 0,83$  року. Різниця розподілу осіб у дослідженні за статтю не було: серед осіб контрольної групи жінок було 52,0 %, чоловіків — 48,0 %, серед пацієнтів з ЦД2 і ДР — 45,7 і 54,3 % відповідно

( $p = 0,495$ ). Дослідження було проспективним когортним, «випадок — контроль». Пацієнти, які були залучені в дослідження, надавали інформовану згоду.

Усі дослідження проведені з дотриманням основних біоетичних норм і вимог Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (1977 р.), відповідного положення ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.) і Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009.

Усі пацієнти надали інформовану згоду на участь у дослідженні.

Пацієнти, що були відібрані в дане дослідження, мали ЦД2 і вперше зверталися по спеціалізовану офтальмологічну допомогу. Усім пацієнтам були виконані загальноприйняті офтальмологічні дослідження, що включали візіометрію, рефрактометрію, тонометрію з визначенням внутрішньоочного тиску (мм рт.ст.), статичну периметрію, гоніоскопію, біомікроскопію, офтальмоскопію. Офтальмоскопію виконували за допомогою асферичної лінзи Volk 90D (USA) і контактної тридзеркальної лінзи Гольдмана відповідно до протоколу ETDRS [15]. Усім пацієнтам виконували дослідження на оптичному когерентному томографі (ОКТ) SWEPT source OCT Triton plus (Topcon, Японія) у режимі ОКТ за протоколом сканування 3D Macula (H) 7\*7 mm і фото очного дна. У всіх пацієнтів була діагностована ДР. Стадію ДР визначали за Інтернаціональною клінічною шкалою тяжкості ДР Американської академії офтальмології (2002 рік). За результатами обстеження пацієнтів розподілили на 3 групи: 1-ша ( $n = 10$ ) — з легкою непроліферативною ДР (НПДР), 2-га ( $n = 33$ ) — з помірною і тяжкою НПДР і 3-тя ( $n = 38$ ) — з проліферативною ДР (ПДР). Контрольну групу становили 50 пацієнтів (50 очей) із ЦД2, нормалізованим вуглеводним обміном, ДР 0 (ретинопатія відсутня) і відсутністю ДМН.

Визначали наявність ДМН за такими критеріями оптичної томографії: перший заснований на збільшенні товщини макулярної ділянки сітківки згідно з решіткою ETDRS, другий критерій визначав присутність інтратретинальної рідини на двовимірних томографічних зрізах (B-scan). Діагноз ДМН встановлювали при визначенні потовщення сітківки макулярної ділянки, яке перевищувало значення нормативної бази даних ОКТ, що враховувала стать, вік і расу пацієнта. Збільшення товщини сітківки виражалось в перцентилях, що підсвічувалось помаранчевим і рожевим кольором по шкалі та відповідало потовщенню сітківки в програмному забезпеченні приладу. Для аналізу допускали знімки ОКТ доброї якості, що відповідали індексу градації якості понад 40.

Ступінь тяжкості ДМН визначали за Інтернаціональною клінічною шкалою тяжкості ДМН Американської академії офтальмології (2003 р.). ДМН 0 визначали за знімками сітківки з товщиною ділянки макули, що відповідала середньостатистичній нормі (всі 9 секторів решітки ETDRS позначалися зеленим кольором), на яких не фіксували наявності інтратретинальної ріди-

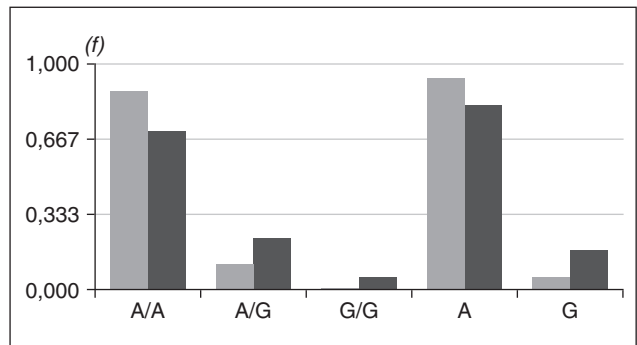
ни на В-scan у всіх секторах. ДМН 1 (легкий ступінь) відповідали знімки зі збільшеною товщиною сітківки в секторах 6–9 решітки ETDRS, що позначалися помаранчевим або рожевим кольором, причому в секторах 1–5 товщина макули відповідала нормі (маркування зеленим); не визначалося ознак інтратретинальної рідини в секторах 1–5. При ДМН 2 (середній ступінь тяжкості) товщина ділянки макули була підвищена в секторах 2–5 решітки ETDRS, що позначалися помаранчевим або рожевим кольором, причому в секторі 1 товщина відповідала нормі. Критерієм відповідності ДМН 3 (тяжкий ступінь) було маркування рожевим кольором, що відповідало потовщенню в секторі 1. Наявність інтратретинальної рідини відзначалася в секторі 1. Окремо аналізували центральну товщину сітківки (ЦТС, мкм) і загальний об’єм сітківки (ЗОС, мм<sup>3</sup>). Порушення вуглеводного обміну визначали за рівнем глюкози венозної плазми натще і вмістом у крові глікованого гемоглобіну (HbA1c).

Генотипи поліморфізму гена *TLR4* rs4986790 (896A/G; Asp299Gly; chr9:117713024 (GRCh38.p14)) визначали методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі із застосуванням ампліфікатора Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). Геномну ДНК виділяли з венозної крові (PureLink<sup>®</sup> Genomic DNA Kit For Purification of Genomic DNA; INVITROGEN; США). Для генетичного аналізу застосовано тест-системи TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США).

Для статистичних досліджень використано програмні пакети MedStat і MedCalc v.15.1 (MedCalc Software bvba). При проведенні аналізу генетичних даних була проаналізована загальна таблиця випадків і частот генотипів і алелей, потім — частотні різниці, які вказували на вплив генотипів і алелей на розвиток захворювання [16]. Для значущих відмінностей розглянуто співвідношення шансів і 95% довірчий інтервал, тобто асоціацію з ЦД2 (генетичний ризик). Використано метод побудови моделей логістичної регресії. Результуюча ознака — наявність у пацієнта ДР і ДМН (прогнозована змінна  $Y = 1$ , будь-яка стадія, 81 випадок) або їх відсутність (прогнозована змінна  $Y = 0$ , 50 випадків).

## Результати та обговорення

За наявністю ДР і ДМН у пацієнтів із ЦД2 була відзначена чітка і статистично вірогідна тенденція до зменшення частоти предкового генотипу *A/A* і алелі *A* при



**Рисунок 1. Розподіл частот генотипів і алелей rs4986790 гена *TLR4* у пацієнтів дослідних груп; статистична значущість за критерієм  $\chi^2$ -квадрат розбіжностей частот генотипів становила  $p = 0,0396$ ; алелей —  $p = 0,005$ . За вертикальною віссю — частоти (f); за горизонтальною — генотипи і алелі**

збільшенні частоти гетерозиготи, мінорної гомозиготи *G/G* і алелі *G* (рис. 1).

Такий перерозподіл частоти поліморфних генотипів дозволяв припустити, що поліморфізм rs4986790 гена *TLR4* мав зв'язок з розвитком очних діабетичних ускладнень у пацієнтів з ЦД2, що було включено до даного дослідження. Розрахунок впливу поліморфізму rs4986790 на розвиток ДР і ДМН виявив чітку асоціацію із захворюванням (табл. 1).

Аналіз впливу генотипів показав, що поліморфізм rs4986790 мав зв'язок з розвитком ДР і ДМН ( $\chi^2 = 6,46$ ;  $p = 0,040$ ). Їх ризик у носіїв гетерозиготи і мінорної гомозиготи був збільшений у 3 рази (СШ = 3,09; 95% ДІ 1,16–8,20) порівняно з носіями предкової гомозиготи *A/A*. Відповідно наявність алелі *G* також збільшувала ризик (СШ = 3,42; 95% ДІ 1,36–8,55) порівняно з носійством алелі *A*.

Отже, носійство мутантної алелі *G* rs4986790 можна було розглядати як фактор ризику розвитку ДР і ДМН при ЦД2, а поліморфізм rs4986790 можна вважати ризиковим для ДР і ДМН.

Порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування підтвердило отриманий результат і показало статистичну значущість розподілу частот для домінантної моделі (табл. 2).

Розподіл генотипів rs4986790 за домінантною моделлю успадкування (*A/A* vs *A/G+G/G*) мав статистичну значущість за критерієм  $\chi^2$  Пірсона ( $\chi^2 = 4,49$ ;  $p = 0,034$ ), тоді як розподіл генотипів за рецесивною моделлю

**Таблиця 1. Вплив розподілу частот генотипів rs4986790 гена *TLR4* на розвиток очних діабетичних ускладнень і ступінь їх асоціації з ДР і ДМН**

Генотипи	ЦД2+ДР+ДМН, n (f)	ЦД2, n (f)	$\chi^2$	p	СШ	95% ДІ
A/A	57 (0,704)	44 (0,880)	6,46	0,040	3,09	1,16–8,20
A/G	19 (0,234)	6 (0,120)				
G/G	5 (0,062)	0 (0,000)				
A	133 (0,821)	94 (0,940)	6,57	0,010	3,42	1,36–8,55
G	29 (0,179)	6 (0,060)				

**Примітки:** n — кількість; f — частота;  $\chi^2$  — критерій Пірсона з урахуванням поправки на безперервність; p — статистична значущість розбіжностей між групами.

успадкування значущим не був ( $\chi^2 = 1,75$ ;  $p = 0,186$ ). Такий результат підтвердив наявність асоціації з очними ускладненнями в пацієнтів із ЦД2 саме за наявності в генотипі мутантного алеля *G*.

Розрахунок асоціації із захворюванням показав збільшення ризику ДР і ДМН серед пацієнтів з ЦД2 для носіїв гетерозиготи і мутантної гомозиготи *G/G* rs4986790 порівняно з носіями предкової гомозиготи *A/A* (СШ = 3,09; 95% ДІ 1,16–8,20).

Отже, при ЦД2 поліморфізм rs4986790 мав асоціацію з розвитком ДР і ДМН: носії поліморфної алелі *G* мали триразове збільшення ризику розвитку цих ускладнень ЦД2.

Збереження виявленого зв'язку генотипів rs4986790 було перевірено при стратифікації пацієнтів за стадією ДР і ступенем ДМН. Статистична значущість

різниць збереглася для розподілу алелей ( $p = 0,029$ ) і підтвердила збільшення частоти алелі *G* за стадіями ДР (табл. 3).

Але при проведенні апостеріорних порівнянь виявлено значущу відмінність розподілу за частотою алелей тільки для 3-ї групи (пацієнти з ПДР) порівняно з контролем ( $p = 0,048$ ). Для 1-ї і 2-ї груп (пацієнти з НПДР) різниця частот як генотипів, так і алелей була не значимою ( $p > 0,05$ ).

Стратифікація пацієнтів за ступенем ДМН і порівняння частот генотипів і алелей rs4986790 з контролем показала збереження статистичної значущості різниць і для генотипів ( $p = 0,017$ ), і для алелей ( $p < 0,001$ ), що також підтверджувало загальну тенденцію до збільшення частоти ризикової алелі *G* за ступенем ДМН (табл. 4).

**Таблиця 2. Вплив розподілу частот генотипів rs4986790 гена TLR4 на розвиток ДР і ДМН (домінантна й рецесивна моделі успадкування)**

Генотипи		ЦД2+ДР+ДМН, n (f)	ЦД2, n (f)	$\chi^2$	p	СШ	95% ДІ
Дом.	A/A	57 (0,704)	44 (0,880)	4,49	0,034	Референтний	
	A/G+G/G	24 (0,296)	6 (0,120)			3,09	1,16–8,20
Рец.	A/A+A/G	76 (0,938)	50 (0,100)	1,75	0,186	Референтний	
	G/G	5 (0,062)	0 (0,000)			–	–

**Примітки:** n — кількість; f — частота;  $\chi^2$  — критерій Пірсона з урахуванням поправки на безперервність; p — статистична значущість розбіжностей між групами.

**Таблиця 3. Розподіл генотипів і алелей поліморфізму rs4986790 гена TLR4 у групах хворих за стадіями ДР**

Генотипи	Групи хворих за стадіями ДР, n (f)			
	Контроль (ДР 0)	1-ша (легка НПДР)	2-га (помірна або тяжка НПДР)	3-тя (ПДР)
A/A	44 (0,880)	6 (0,600)	25 (0,758)	26 (0,684)
A/G	6 (0,120)	4 (0,400)	6 (0,182)	9 (0,237)
G/G	0 (0,000)	0 (0,000)	2 (0,061)	3 (0,079)
p	0,127			
A	99 (0,940)	16 (0,800)	56 (0,848)	61 (0,803)
G	6 (0,006)	4 (0,200)	10 (0,152)	15 (0,197)
p	0,029			

**Примітки:** n — кількість; f — частота; p — значущість відмінностей за критерієм  $\chi$ -квадрат Pearson з урахуванням поправки на безперервність.

**Таблиця 4. Розподіл генотипів і алелей поліморфізму rs4986790 гена TLR4 у групах хворих за ступенем ДМН**

Генотипи	Групи хворих за ступенем ДМН, n (f)			
	ДМН 0	ДМН 1	ДМН 2	ДМН 3
A/A	44 (0,880)	13 (0,867)	17 (0,773)	27 (0,614)
A/G	6 (0,120)	2 (0,133)	5 (0,227)	12 (0,273)
G/G	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	5 (0,114)
p	0,017			
A	94 (0,940)	28 (0,903)	39 (0,886)	66 (0,750)
G	6 (0,060)	2 (0,133)	5 (0,114)	22 (0,250)
p	< 0,001			

**Примітки:** n — кількість; f — частота; p — значущість відмінностей за критерієм  $\chi$ -квадрат Pearson з урахуванням поправки на безперервність.

При проведенні апостеріорних порівнянь, як і для ДР, підтверджено статистично значущу відмінність розподілу частот генотипів і алелей порівняно з контролем тільки для ДМН 3 ( $p < 0,05$ ).

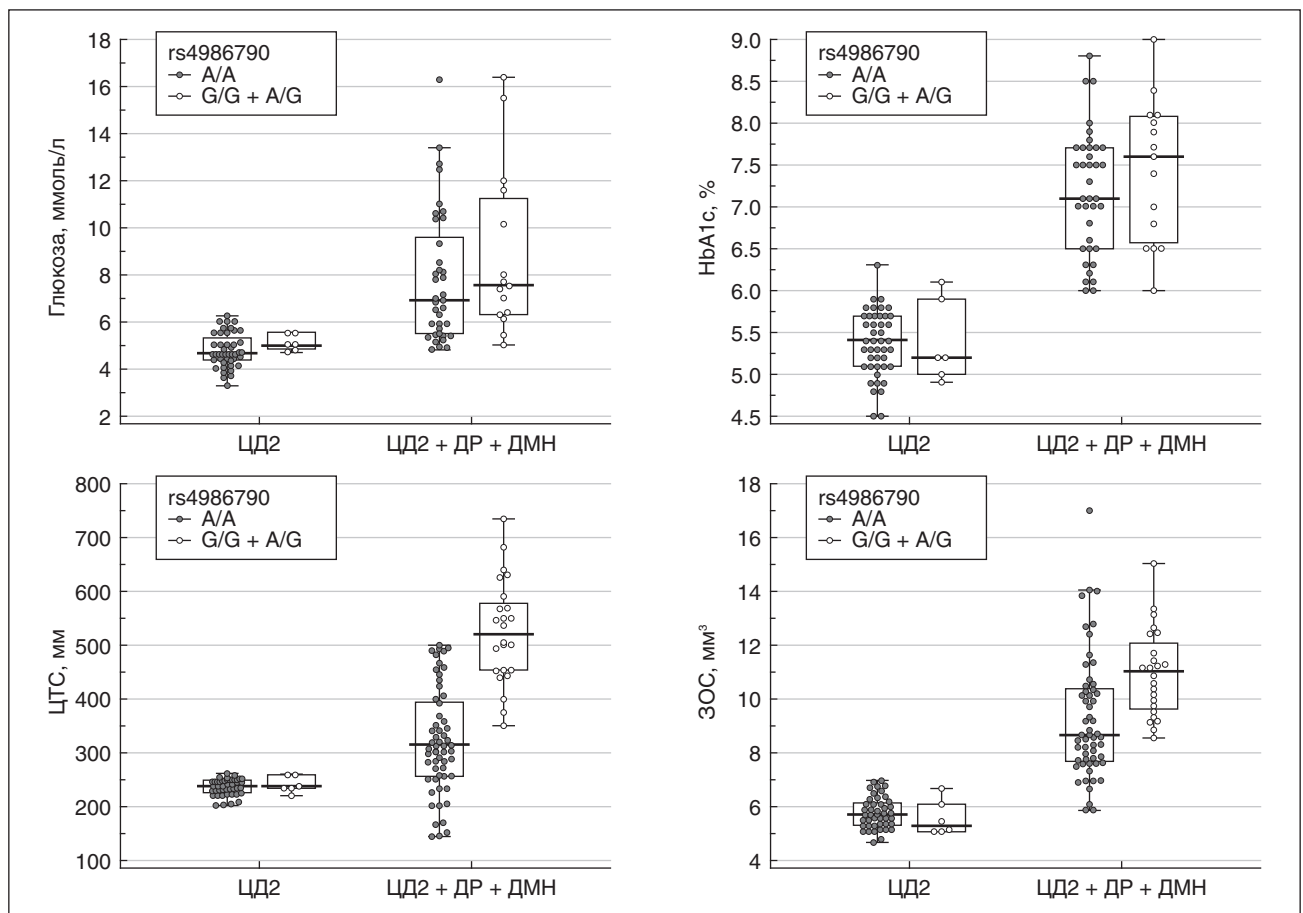
Отже, значущі статистичні відмінності ( $p < 0,001$ ) частоти поліморфізму rs4986790 зберігалися тільки для ПДР і ДМН 3.

Оцінка зв'язку генотипів з фенотиповими показниками по групах пацієнтів виявила деякі закономірності (рис. 2).

За показниками вуглеводного обміну вірогідних розбіжностей між носіями різних генотипів rs4986790 виявлено не було ( $p > 0,05$ ), однак вміст і глюкози, і глікованого гемоглобіну був дещо вищим у пацієнтів з ДР і ДМН, ніж без таких ( $p < 0,001$ ).

ЦТС і ЗОС за наявності ДР і ДМН також були вірогідно вищими від показників пацієнтів без них серед носіїв усіх генотипів rs4986790 ( $p < 0,001$ ). При цьому ЦТС у пацієнтів з ДР і ДМН, які були носіями поліморфної алелі G, був суттєво більшим, ніж у носіїв предкової гомозиготи A/A (520,0 мкм (453,0–579,5 мкм) vs 313,0 мкм (256–393 мкм) відповідно;  $p < 0,001$ ). Для ЗОС така різниця хоч і була наявною, але статистичної значущості не мала (11,0 мкм<sup>3</sup> (9,7–12,1 мкм<sup>3</sup>) vs 8,7 мкм<sup>3</sup> (7,7–10,4 мкм<sup>3</sup>) відповідно;  $p = 0,149$ ).

Отже, можна було стверджувати, що носії поліморфізму rs4986790 мали більш виражений набряк сітківки за умови присутності в генотипі мутантної алелі G. Отримані дані давали підставу зв'язати поліморфізм rs4986790 з більшим діабетогенним набряком сітківки.

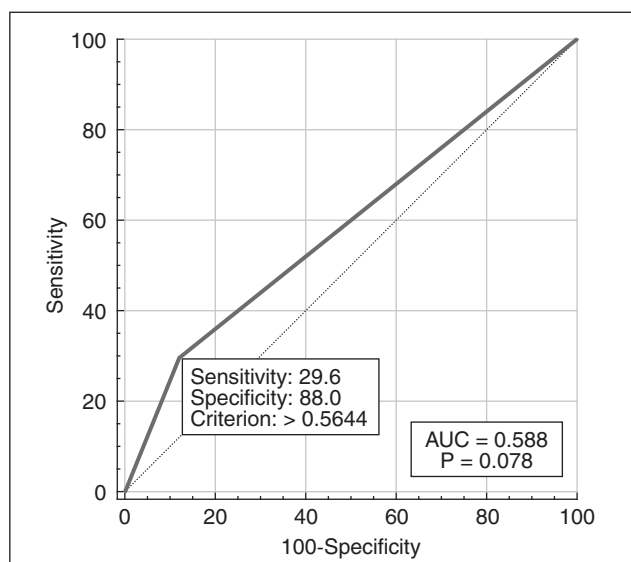


**Рисунок 2.** Результати двоваріантного аналізу показників вуглеводного обміну (вміст у крові глюкози (ммоль/л) і глікованого гемоглобіну (%)) та офтальмологічних показників (ЦТС, мкм, і ЗОС, мкм<sup>3</sup>) у пацієнтів — носіїв різних генотипів rs4986790 гена TLR4 із ЦД2 з наявністю і відсутністю ДР і ДМН ( $p < 0,001$  для всіх порівнянь пацієнтів з ДР і ДМН з групою пацієнтів без них). Сірі кружечки — дані пацієнтів — носіїв відповідних генотипів; горизонтальні рисочки у прямокутниках — медіани (Me); у прямокутниках — значення I і III кватилів ( $Q_1$ - $Q_{III}$ ), вертикальні планки з ризиками — мінімальні й максимальні значення.

**Таблиця 5.** Аналіз однофакторної моделі логістичної регресії ризику ДР і ДМН у носіїв різних генотипів rs4986790

Генотип	Коефіцієнт моделі, $b \pm m$	p	СШ (95% ДІ)
A/A		Референтний	
A/G+G/G	1,12 ± 0,50	0,024	3,1 (1,2–8,2)

Примітка: p — рівень значимості відмінності СШ від 1.



**Рисунок 3. ROC-крива прогнозування ризику ДР і ДМН у пацієнтів із ЦД2 за наявності поліморфізму rs4986790 гена *TLR4***

На останньому етапі був проведений однофакторний регресійний аналіз залежності розвитку ДР і ДМН у пацієнтів з ЦД2 від генотипів поліморфізму rs4986790 (табл. 5).

Виявлено збільшення ( $p = 0,024$ ) ризику розвитку ДР і ДМН у носіїв генотипів *A/G* і *G/G* rs4986790 (СШ = 3,1; 95% ДІ 1,2–8,2) порівняно з носіями предкового генотипу *A/A*. На рис. 3 подано криву операційних характеристик для цього тесту.

Площа під ROC-кривою (AUC) = 0,59 (95% ДІ 0,50–0,67), що свідчило про наявність слабкого зв'язку з rs4986790. При виборі оптимального порогу (*A/G* або *G/G* rs4986790) чутливість тесту становила 29,6 % (95% ДІ 20,0–40,8 %), специфічність — 88,0 % (95% ДІ 75,7–95,5%). Низьке значення чутливості такого тесту не дозволяло рекомендувати його для клінічного застосування, але можливість побудови такої моделі математично доводила значення поліморфізму rs4986790 гена *TLR4* для виникнення ДР і ДМН у пацієнтів з ЦД2 — у його носіїв ризик їх розвитку був збільшений втричі.

Отже, у даному дослідженні було встановлено, що поліморфізм rs4986790 гена *TLR4* мав зв'язок з такими очними ускладненнями ЦД2, як ДР і ДМН, ризик їх розвитку в носіїв мутантної алелі *G* (генотипи *A/G* і *G/G*) був утричі більший порівняно з носіями предкового генотипу *A/A*. При цьому значення поліморфізму могло проявлятися в збільшенні діабетогенного набряку сітківки.

Ці результати добре узгоджувалися з даними щодо асоціації алелі *G* поліморфізму Asp299Gly гена *TLR4* з підвищеним ризиком серцево-судинних захворювань і ДР у пацієнтів із ЦД2 [17]. Носії алелі *G* Asp299Gly мали подвійний ризик ДР (СШ 2,12; 95% ДІ 1,43–3,12;  $p = 0,0002$ ) порівняно з носіями алелі *A*. Більш переконливі результати отримані при дослідженні 113 пацієнтів із ЦД2: пацієнти — носії гетерозиготи Asp299Gly мали

більшу поширеність ДР (42,9 %), ніж носії гомозиготи (9,0 %),  $p = 0,018$  [18]. У наших дослідженнях таке співвідношення становило 23,4 і 12,0 % (табл. 1), що також було статистично значущим ( $p = 0,040$ ).

Отже, наші результати підтвердили думку про наявність асоціації поліморфізму rs4986790 гена *TLR4* з розвитком ДР, а також доповнили їх в плані виявлення факту збереження такого зв'язку за умов стратифікації пацієнтів за тяжкістю патологічного процесу для ПДР і ДМН 3 (табл. 3, 4). Біоінформаційне дослідження, що було процитоване вище, також показало зв'язок гена *TLR4* саме з ангиогенезом і неоваскуляризацією сітківки при ЦД2 [7].

Пояснити механізм виявленого зв'язку поліморфізму rs4986790 гена *TLR4* з ДР можна, виходячи з розуміння того, що надмірна активація вродженої імунної системи, що притаманна пацієнтам з ЦД2, які є носіями алелі *G*, може бути одним з чинників ДР [19]. *TLR4* є ключовим тригером імунітету, і саме місенс-мутація гена *TLR4* підтримують запалення в умовах гіперглікемії.

Імовірно, що носії мутантної алелі *G* rs4986790 мають більшу схильність до розвитку прозапальних змін у сітківці, що реалізуються через патологічні внутрішньоклітинні ланцюги, у тому числі через ядерний фактор NF-κB [6, 7]. Гіперактивність цієї ланки вродженого імунітету може бути чинником розвитку як ДР, так і ДМН.

*TLR4* є центральним рецептором вродженої імунної відповіді і відіграє важливу роль як тригер запальної реакції, який збільшує резистентність до інсуліну, а генетичні варіанти гена *TLR4* відіграють важливу роль у розвитку інсулінорезистентності та ЦД2 [20]. На підтвердження цього припущення автори показали, що, з одного боку, рівні прозапальних цитокінів (TNF-α, IL-6, MCP-1 та IL-1β) були пов'язані з діабетом і резистентністю до інсуліну, а з іншого — з генетичними варіантами гена *TLR4*, у тому числі rs4986790.

Особливістю даного дослідження є вивчення не тільки зв'язку rs4986790 з ДР та її стадіями, як це було показано в багатьох цитованих дослідженнях, але і з ДМН і його ступенем. Саме в цьому плані був отриманий найбільш цікавий результат дослідження — більша величина ЦТС, а відповідно, і більший ступінь ДМН у пацієнтів — носіїв мутантної алелі (рис. 2). Це доводить роль поліморфізму rs4986790 у запальній патологічній ексудації сітківки за наявності ЦД2 і відкриває перспективу використання медикаментозного блокування шляху TLR/NF-κB саме в носіїв мутантної алелі *G*. Такий терапевтичний підхід, але без урахування генотипу *TLR4*, активно розробляється останнім часом [21, 22].

## Висновки

1. У пацієнтів із ЦД2 поліморфізм rs4986790 гена *TLR4* мав зв'язок з розвитком ДР і ДМН за домінантною моделлю успадкування ( $p = 0,034$ ): ризик їх розвитку у носіїв генотипів *A/G+G/G* був утричі більшим (СШ = 3,09; 95% ДІ 1,16–8,20) порівняно з носіями генотипу *A/A*.



2. При стратифікації за стадіями ДР і ступенем ДМН відмінності в розподілі генотипів і алелей порівняно з контролем зберігалися тільки для ПДР (для алелей —  $p = 0,048$ ) і ДМН 3 (для генотипів —  $p = 0,017$ ; для алелей —  $p < 0,001$ ).

3. Аналіз зв'язку з фенотипом пацієнтів показав більші показники глікемії, вмісту глікованого гемоглобіну, ЦТС і ЗОС у носіїв гетерозиготи й мінорного генотипу *G/G*, що відповідало більшому порушенню вуглеводного обміну і пошкодженню сітківки порівняно з носіями предкової гомозиготи *A/A*.

4. При проведенні регресійного аналізу отримані результати були підтверджені: ризик ДР і ДМН у пацієнтів з ЦД2, які були носіями генотипів *A/G* і *G/G*, був більшим ( $p = 0,024$ ) порівняно з носіями предкової гомозиготи *A/A* (СШ = 3,1; 95% ДІ 1,2–8,2).

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

## Список літератури

- Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. 2021 Nov;128(11):1580-1591. doi: 10.1016/j.ophtha.2021.04.027.
- Ixamey M, Palma C. Diabetic macular edema. *Dis Mon*. 2021 May;67(5):101138. doi: 10.1016/j.disamonth.2021.101138.
- Bayan N, Yazdanpanah N, Rezaei N. Role of toll-like receptor 4 in diabetic retinopathy. *Pharmacol Res*. 2022 Jan;175:105960. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105960. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34718133.
- Aghamiri SH, Komlakh K, Ghaffari M. The crosstalk among TLR2, TLR4 and pathogenic pathways; a treasure trove for treatment of diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*. 2022 Feb;30(1):51-60. doi: 10.1007/s10787-021-00919-3.
- Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 17;2:16012. http://doi.org/10.1038/nrdp.2016.12.
- Rykov S, Ziablitsev S, Mogilevskyy S, Panchenko Iu, Biliaeva O, Lavryk N. The Role of Gene Polymorphisms rs1800629 TNF $\alpha$  and rs1800818 PDGFB in Relapses after Surgical Treatment of Diabetic Maculopathy. *Ophthalmology. Eastern Europe*. 2020;3(10):285-292. doi: 10.34883/PI.2020.10.3.015.
- Gu C, Lhamo T, Zou C, Zhou C, Su T, Draga D et al. Comprehensive analysis of angiogenesis-related genes and pathways in early diabetic retinopathy. *BMC Med Genomics*. 2020 Sep 29;13(1):142. doi: 10.1186/s12920-020-00799-6.
- Wang N, Ding L, Liu D, Zhang Q, Zheng G, Xia X, Xiong S. Molecular investigation of candidate genes for pyroptosis-induced inflammation in diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jul 25;13:918605. doi: 10.3389/fendo
- Wong YH, Wong SH, Wong XT, Yap QY, Yip KY, Wong LZ et al. Genetic associated complications of type 2 diabetes mellitus. *Panminerva Med*. 2022 Jun;64(2):274-288. doi: 10.23736/S0031-0808.21.04285-3.
- Balistreri CR, Bonfigli AR, Boemi M, Olivieri F, Ceriello A, Genovese S et al. Evidences of +896 A/G TLR4 polymorphism as an indicative of prevalence of complications in T2DM patients. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:973139. doi: 10.1155/2014/973139.
- Zhang Y, Li H, Wang C, Lv H, Fu S. Toll like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism increases the risk of diabetic microvascular complications: a meta analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2022 Jun 7;14(1):79. doi: 10.1186/s13098-022-00849-2.
- Fan J, Liang R. Quantitative assessment of TLR4 gene polymorphisms and T2DM risk: A meta-analysis. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Oct;8(10):e1466. doi: 10.1002/mgg3.1466.
- Buraczynska M, Baranowicz-Gaszczyk I, Tarach J, Ksiazek A. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol*. 2009 Feb;70(2):121-4. doi: 10.1016/j.humimm.2008.12.003.
- Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, Sidiropoulos A, Gerovassili A, Satra M et al. TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease. *Eur J Endocrinol*. 2011 Aug;165(2):261-7. doi: 10.1530/EJE-11-0280.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs — an extension of the modified Airlie house classification: ETDRS report № 10. *Ophthalmology*. 2020 Apr;127(4S): 99-119. http://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.01.030.
- Гур'янов В.Г., Лях Ю.Є., Парій В.Д., Короткий О.В., Чалий О.В., Чалий К.О., Цехмістер Я.В. Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакемі EZR (R-statistics). Київ: Вістка, 2018. 208 с.
- Buraczynska M, Zukowski P, Ksiazek K, Wacinski P, Dragan M. The effect of Toll-like receptor 4 gene polymorphism on vascular complications in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016 Jun;116:7-13. doi: 10.1016/j.diabres.2016.04.002. Epub 2016 Apr 26. PMID: 27321310.
- Zaharieva ET, Kamenov ZA, Savov AS. TLR4 polymorphisms seem not to be associated with prediabetes and type 2 diabetes but predispose to diabetic retinopathy; TLR4 polymorphisms in glucose continuum. *Endocr Regul*. 2017 Jul 1;51(3):137-144. doi: 10.1515/enr-2017-0014.
- Singh K, Kant S, Singh VK, Agrawal NK, Gupta SK, Singh K. Toll-like receptor 4 polymorphisms and their haplotypes modulate the risk of developing diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Mol Vis*. 2014 May 27;20:704-13. PMID: 24883015; PMCID: PMC4037533.
- Degirmenci I, Ozbayer C, Kebapci MN, Kurt H, Colak E, Gunes HV. Common variants of genes encoding TLR4 and TLR4 pathway members TIRAP and IRAK1 are effective on MCP1, IL6, IL1 $\beta$ , and TNF $\alpha$  levels in type 2 diabetes and insulin resistance. *Inflamm Res*. 2019 Sep;68(9):801-814. doi: 10.1007/s00011-019-01263-7.
- Fang M, Wan W, Li Q, Wan W, Long Y, Liu H, Yang X. Asiatic acid attenuates diabetic retinopathy through TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 mediated modulation of microglia polarization. *Life Sci*. 2021 Jul 15;277:119567. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119567.
- Shu X, Hu Y, Huang C, Wei N. Nimbolide ameliorates the streptozotocin-induced diabetic retinopathy in rats through the inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Saudi J Biol Sci*. 2021 Aug;28(8):4255-4262. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.06.039.

Отримано/Received 05.02.2024

Рецензовано/Revised 16.02.2024

Прийнято до друку/Accepted 26.02.2024 ■

**Information about authors**

Sergiy Rykov, MD, DSc, PhD, Professor, Corresponding Member of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Honored doctor of Ukraine, Head of the Department of Ophthalmology and Optometry of Postgraduate Education, Institute of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine; e-mail: ophthalm.optom@nmu.ua; phone: +380 (44) 521-07-57; <http://orcid.org/0000-0001-8925-6456>

Yelyzaveta Galytska, Assistant, Department of Ophthalmology and Optometry of Postgraduate Education, Institute of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine; e-mail: ophthalm.optom@nmu.ua; <http://orcid.org/0009-0000-2671-4990>

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

S.O. Rykov, Y.P. Galytska

Institute of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

### The significance of the *TLR4* gene rs4986790 polymorphism in the development of diabetic retinopathy and diabetic macular edema in type 2 diabetes

**Abstract. Background.** The basis of retinal damage in type 2 diabetes mellitus (T2DM) is the development of chronic metabolic inflammation; the triggering role in its activation belongs to Toll-like receptors (TLR). Chronic hyperglycemia increases TLR expression, which activates proinflammatory pathways of diabetic retinal damage. The purpose was to determine the significance of the rs4986790 (896A/G, Asp299Gly) polymorphism of the *TLR4* gene for the development of diabetic retinopathy (DR) and diabetic macular edema (DME) in T2DM. **Materials and methods.** The study included 81 patients (81 eyes) with T2DM who had DR and DME according to the 2002 American Academy of Ophthalmology guidelines, the control group consisted of 50 patients (50 eyes) with T2DM, normalized carbohydrate metabolism, DR 0 (no retinopathy) and without DME. rs4986790 genotypes were determined by real-time polymerase chain reaction using the Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 7500 amplifier (Applied Biosystems, USA) and TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (USA). MedStat and MedCalc v.15.1 software packages (MedCalc Software bvba) were used for statistical research. **Results.** In T2DM, the rs4986790 polymorphism of

the *TLR4* gene was associated with the development of DR and DME according to a dominant inheritance model ( $p = 0.034$ ); their risk in genotypes *A/G* + *G/G* carriers was 3-fold increased (OR = 3.09; 95% CI 1.16–8.20) in comparison with carriers of the *A/A* genotype. When stratifying by DR stages and DME degree, the relationships were preserved only for proliferative DR (for alleles,  $p = 0.048$ ) and DME degree 3 (for genotypes,  $p = 0.017$ ; for alleles,  $p < 0.001$ ). Analysis of the relationship with the phenotype of patients showed greater glycemia, glycosylated hemoglobin content, central thickness, and retinal volume in carriers of the heterozygous and minor *G/G* genotype compared to carriers of the ancestral homozygote *A/A*. Regression analysis confirmed the obtained results: the risk of DR and DME in T2DM patients who were carriers of the *A/G* and *G/G* genotypes was higher ( $p = 0.024$ ) compared to carriers of the ancestral homozygote *A/A* (OR = 3.1; 95% CI 1.2–8.2). **Conclusions.** The conducted study showed the risk role of the rs4986790 polymorphism of the *TLR4* gene in the occurrence of DR and DME in T2DM.

**Keywords:** inflammation; central retinal thickness; retinal volume; regression analysis