

## Зв'язок поліморфізму rs1927911 гена TLR4 з діабетичною ретинопатією та діабетичним макулярним набряком за цукрового діабету 2 типу

С. О. Риков, д-р мед. наук, професор, член-кор. НАМН України; Є. П. Галицька, Д. В. Жмурик, д-р мед. наук; В. А. Дуфинець, д-р мед. наук

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця  
Київ (Україна)

Приватне підприємство «Світ здоров'я»  
Мукачеве (Україна)

**Актуальність.** Генетична схильність є одним із факторів, що викликають очні ускладнення цукрового діабету 2 типу (ЦД2), зокрема поліморфізми гена Toll-подібного рецептора-4 (TLR4) по-різному асоційовані з розвитком мікроциркуляторних ускладнень ЦД2.

**Мета** – встановити зв'язок поліморфізму rs1927911 гена TLR4 з діабетичною ретинопатією (ДР) і діабетичним макулярним набряком (ДМН) при ЦД2.

**Матеріал та методи.** Дослідження включало 81 пацієнта (81 око) із ЦД2, у яких за настановами Американської академії офтальмології (2002 рік) виявлено ДР і ДМН, контрольну групу становили 50 пацієнтів (50 очей) із ЦД2, нормалізованим вуглеводним обміном, ДР 0 (ретинопатія відсутня) та відсутнім ДМН. Генотипи rs1927911 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).

**Результати.** Поліморфізм rs1927911 гена TLR4 мав зв'язок із розвитком ДР і ДМН ( $p=0,021$ ): їх ризик у носіїв алелі А зменшено ( $ВШ=0,42$ ; 95% ВІ 0,23–0,77) порівняно з носіями предкової алелі G. Розподіл генотипів rs1927911 мав статистичну значущість за критерієм  $\chi^2$  Пірсона за домінантною моделлю успадкування (GG проти GA+AA;  $p=0,012$ ;  $ВШ=0,37$ ; 95% ВІ 0,18–0,76). Під час стратифікації за стадіями ДР і ДМН такий зв'язок зберігався тільки для проліферативної ДР і ДМН 3 ступеня. Аналіз зв'язку з фенотипом виявив менші глікемію, уміст глікованого гемоглобіну, центральну товщину й загальний об'єм сітківки в носіїв гетерозиготи й мінорного генотипу AA, що відповідало меншому порушенню вуглеводного обміну та пошкодженню сітківки порівняно з носіями предкової гомозиготи GG.

**Висновок.** З огляду на аналіз ролі TLR4 в механізмах запуску запальної відповіді, можна припустити, що активність сигнальних шляхів, які за умов гіперглікемії реалізуються через TLR4, знижена в носіїв поліморфізму rs1927911, що зумовлює менше пошкодження сітківки.

### Ключові слова:

гіперглікемія, запалення, центральна товщина сітківки, об'єм сітківки, регресійний аналіз, цукровий діабет, діабетична ретинопатія, діабетична макулопатія

**Вступ.** За даними Міжнародної діабетичної федерації, кількість дорослих (віком 20–79 років), що мають цукровий діабет (ЦД), зросла із 285 мільйонів у 2009 році до 463 мільйонів у 2019 році з прогнозом збільшення до 700 мільйонів у 2045 році, а частка пацієнтів із ЦД 2 типу (ЦД2) становить до 95% [1]. Найбільш поширеними очними ускладненнями ЦД2 та основною причиною сліпоти в дорослих працездатного віку залишаються діабетична ретинопатія (ДР) і діабетичний макулярний набряк (ДМН) [2, 3].

ДР є запальним захворюванням, що пов'язано з гіперглікемією, яка є причиною в розвитку запалення, клітинного апоптозу, нейродегенерації, окислювально-го стресу й неоваскуляризації [4].

Toll-подібні рецептори (TLR) – добре відоме сімейство рецепторів розпізнавання образів (PRR), відпо-

відальних за ініціацію запальних та імунних реакцій [5, 6]. TLR4 ідентифікує як ендогенні, так й екзогенні ліганди та асоціюється з різними фізіологічними й патологічними шляхами в організмі. Унаслідок гіперглікемії експресія TLR4 збільшується в діабетичній сітківці, що активує різні шляхи, які призводять до ДР.

Важливим активатором TLR4 в сітківці за умови запалення є білок 1 групи високої мобільності (HMGB1), який безпосередньо сприймає високий рівень глюкози як стресор [7, 8]. Це призводить до посилення запалення через ядерний фактор каппа бета (NF- $\kappa$ B) з формуванням патологічного ланцюга HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B. Лікування експериментального діабету агентами, що

інгібують шлях TLR4/NF-κB, покращувало біохімічні та морфологічні показники пошкодження сітківки [9–11].

Дослідження стверджують, що генетична схильність може бути одним із факторів, які викликають очні ускладнення ЦД2 [12–14]. Розглядаючи роль TLR4 в ДР, кілька дослідників зосередили увагу на асоціації поліморфізмів гена TLR4 й ризику розвитку ДР [14–16]. Так, виявлено, що поліморфізми гена TLR4 асоціюються з підвищеним ризиком серцево-судинних захворювань і діабетичної ретинопатії в пацієнтів із ЦД2 [15, 16], тоді як за іншими даними мають протективний ефект [17].

**Мета роботи** – установити зв'язок поліморфізму rs1927911 гена TLR4 з діабетичною ретинопатією та діабетичним набряком макули за цукрового діабету 2 типу.

### Матеріал та методи

Дослідження було проспективним, когортним, випадок-контроль.

До дослідження залучено 131 пацієнт (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 –  $65,7 \pm 0,83$  років. Різниця розподілу осіб у дослідженні за статтю не було: серед осіб контрольної групи жінок було 52,0%, чоловіків – 48,0%, серед пацієнтів із ЦД2 та ДР, відповідно, – 45,7% і 54,3% ( $p=0,495$ ).

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

Пацієнти, які залучені до дослідження, надавали інформовану згоду.

Пацієнти, відібрані для дослідження, мали ЦД2 та вперше зверталися за спеціалізованою офтальмологічною допомогою. Порушення вуглеводного обміну визначали за рівнем глюкози венозної плазми натще й умістом у крові глікованого гемоглобіну (HbA1c).

Усім пацієнтам виконано загальноприйняті офтальмологічні дослідження, що включали візіометрію, рефрактометрію, тонометрію з визначенням внутрішньоочного тиску (ВОТ; мм рт. ст.), статичну периметрію, гоніоскопію, біомікроскопію, офтальмоскопію. Офтальмоскопію робили за допомогою асферичної лінзи Volk 90D (USA) і контактної тридзеркальної лінзи Гольдмана відповідно до протоколу ETDRS [18]. Усім пацієнтам виконували дослідження на оптичному когерентному томографі (ОКТ) на приладі 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 діагностовано ДР. Стадію ДР визначали за інтернаціональною клінічною

шкалою тяжкості ДР Американської академії офтальмології (2002 рік). За результатами обстеження пацієнтів поділили на 3 групи: 1-а (n=10) – із легкою не-проліферативною ДР (НПДР), 2-а (n=33) – з помірною та тяжкою НПДР, 3-я (n=38) – із проліферативною ДР (ПДР). Контрольну групу становили 50 пацієнтів (50 очей) із ЦД2, зі стажем захворювання до 5 років, нормалізованим вуглеводним обміном, ДР 0 (ретинопатія відсутня) і відсутнім ДМН.

Наявність ДМН визначали за даними таких критеріїв оптичної когерентної томографії: перший критерій оснований на збільшенні товщини макулярної ділянки сітківки згідно з решіткою ETDRS; другий критерій визначав наявність інтратретинальної рідини на двовимірних томографічних зрізах (b-scan). Діагноз ДМН установлювали під час визначення потовщення сітківки ділянки макули, яке перевищувало значення нормативної бази даних ОКТ, що враховувала стать, вік і расу пацієнта. Збільшення товщини сітківки виражалося в перцентилях, що підсвічували помаранчевим і рожевим кольором за шкалою, що відповідало потовщенню сітківки в програмному забезпеченні приладу. Для аналізу допускали знімки ОКТ хорошої якості, які відповідали індексу градації якості більше ніж 40.

Ступінь тяжкості ДМН визначали за інтернаціональною клінічною шкалою тяжкості ДМН Американської академії офтальмології (2003 рік): ступеню ДМН 0 відповідали знімки сітківки з товщиною ділянки макули, що відповідали середньостатистичній нормі (усі 9 секторів решітки ETDRS позначалися зеленим кольором) і не фіксували наявності інтратретинальної рідини на B-scan у всіх секторах. Ступеню ДМН 1 (легкого ступеня) відповідали знімки зі збільшеною товщиною сітківки в секторах 7, 6, 8, 9 решітки ETDRS, що позначали помаранчевим або рожевим кольором, причому в інших секторах 1–5 товщина макули відповідала нормі (маркування зеленим). За критерієм наявності інтратретинальної рідини не визначали її ознак у секторах 1–5. У разі ДМН 2 (середнього ступеня важкості) товщина ділянки макули підвищена в секторах 2–5 решітки ETDRS, що позначали помаранчевим або рожевим кольором, причому в секторі 1 товщина відповідала нормі. Критеріями відповідності ДМН 3 (важкого ступеня) було маркування рожевим кольором, що відповідало потовщенню в секторі 1. За критерієм інтратретинальної рідини її наявність відмічали в секторі 1. Окремо аналізували центральну товщину сітківки (ЦТС, мкм) і загальний об'єм сітківки (ЗОС, мм<sup>3</sup>).

Генотипи поліморфізму гена TLR4rs1927911 (Chr:9.117707776; Intron TLR4) визначали методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі із застосуванням ампліфікатора Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США). Геномну ДНК виділяли з венозної крові (PureLink® Genomic DNA Kit For Purification of Genomic DNA; INVITROGEN; США). Для генетичного аналізу застосовано тест-систему TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США). Генетичні дослідження проводили на базі На-

уково-дослідного інституту клінічної та експериментальної медицини Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (директор – кандидат медичних наук Ю. Г. Клись).

Для статистичних досліджень використано програмні пакети MedStat і MedCalc v.15.1 (MedCalc Software bvba). Під час аналізу генетичних даних проаналізована загальна таблиця випадків і частот генотипів та алелів, потім – частотні різниці, які вказували на вплив генотипів та алелів на розвиток захворювання [19]. Для значущих відмінностей розглянуто відношення шансів (ВШ) та 95% вірогідний інтервал (95% ВІ), тобто асоціацію із 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) чи їх відсутність (прогнозована змінна  $Y=0,50$  випадків).

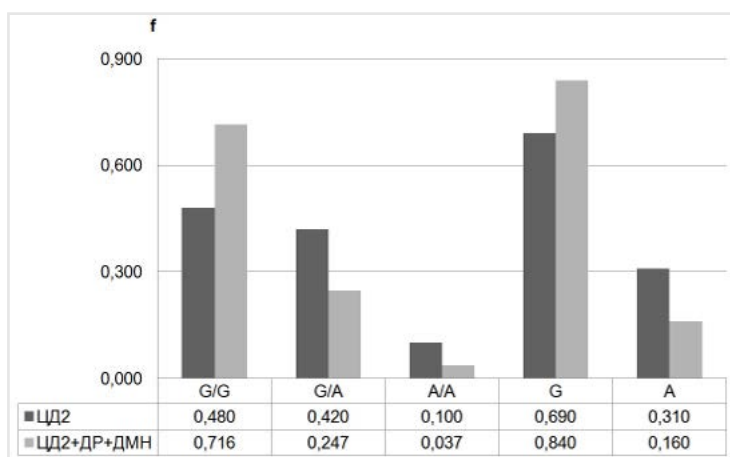
### Результати

Порівняння розподілу генотипів у пацієнтів, що включені до дослідження, з результатами Програми 1000 Genomes Project Phase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>) виявило тотожність отриманих результатів ( $\chi^2=2,96$ ;  $p=0,228$ ). У Програмі визначення частот генотипів rs1927911 гена TLR4 в євро-

пейській популяції проведено в 503 осіб, предковий генотип G/G мав частоту 0,547 (у наших дослідженнях – 0,626), гетерозигота G/A – 0,394 (у наших дослідженнях – 0,313), мутантна гомозигота A/A – 0,060 (у наших дослідженнях – 0,061). Розподіл алелів також суттєво не відрізнявся ( $\chi^2=1,48$ ;  $p=0,224$ ). Згідно з даними Програми, предкова алель G визначена з частотою 0,744 (у наших дослідженнях – 0,782), мутантна алель A – 0,256 (у наших дослідженнях – 0,218). Таким чином, результати контрольної групи за розподілом як генотипів, так й алелів відповідали даним Програми 1000 Genomes Project Phase 3 для європейської популяції.

Під час порівняння дослідних груп (рис. 1) у хворих на ЦД2 з ДР і ДМН відмічена достеменно більша частота предкового гомозиготного генотипу G/G та зменшення частот гетерозиготи G/A й мінорного генотипу A/A ( $p=0,021$ ). Відповідно, достеменно меншою була й частота мінорної алелі A ( $p=0,005$ ).

Таким чином, можна було припустити, що поліморфізм rs1927911 має зв'язок із розвитком очних ускладнень ЦД2. У зв'язку з цим визначено вплив розподілу частот генотипів та алелів rs1927911 на розвиток ЦД2 і ступінь їх асоціації із захворюванням (табл. 1). Тест Харді-Вайнберга для контролю й випадків відповідав випадковому характеру успадкування геноти-



**Рис. 1.** Розподіл частот генотипів та алелів rs1927911 гена TLR4 в пацієнтів дослідних груп; статистична значущість за критерієм ксі-квадрат розбіжностей частот генотипів становила  $p=0,021$ ; алелів –  $p=0,005$ ; за вертикальною віссю – частоти (f); за горизонтальною – генотипи й алелі; G/G, G/A, A/A – генотипи rs1927911; G, A – алелі rs1927911; ЦД2 – група пацієнтів із ЦД2 (контроль), ЦД2+ДР+ДМН – група пацієнтів із ЦД2, ДР і ДМН (випадки).

**Таблиця 1.** Вплив розподілу частот генотипів rs1927911 гена TLR4 на розвиток очних діабетичних ускладнень і ступінь їх асоціації із захворюванням

| Генотипи алелів | ЦД2Т+ДР+ДМН, n (f) | ЦД2, n (f) | $\chi^2$ | p     | ВШ          | 95% ВІ    |
|-----------------|--------------------|------------|----------|-------|-------------|-----------|
| G/G             | 58 (0,72)          | 24 (0,48)  | 7,72     | 0,021 | Референтний |           |
| G/A             | 20 (0,25)          | 21 (0,42)  |          |       | 0,25        | 0,05–1,12 |
| A/A             | 3 (0,04)           | 5 (0,10)   |          |       | 0,39        | 0,18–0,86 |
| G               | 136 (0,84)         | 69 (0,69)  | 7,26     | 0,007 | Референтний |           |
| A               | 26 (0,16)          | 31 (0,31)  |          |       | 0,42        | 0,23–0,77 |

Примітки: ЦД2+ДР+ДМН – група пацієнтів із ЦД2, ДР і ДМН (випадки), ЦД2 – група пацієнтів із ЦД2 (контроль), n (f) – кількість і частота пацієнтів-носіїв певного генотипу або алеля;  $\chi^2$  – критерій Пірсона з урахуванням поправки на неперервність; p – статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ – відношення шансів; 95% ВІ – 95% вірогідний інтервал для ВШ.

**Таблиця 2.** Вплив розподілу частот генотипів rs1927911 гена TLR4 на розвиток очних діабетичних ускладнень (домінантна й рецесивна моделі успадкування)

| Генотипи |         | ЦД2+ДР+ ДМН, n (f) | ЦД2, n (f) | $\chi^2$ | p     | ВШ          | 95% ВІ    |
|----------|---------|--------------------|------------|----------|-------|-------------|-----------|
| Дом.     | G/G     | 58 (0,72)          | 24 (0,48)  | 6,38     | 0,012 | Референтний |           |
|          | G/A+A/A | 23 (0,28)          | 26 (0,52)  |          |       | 0,37        | 0,18–0,76 |
| Рец.     | G/G+G/A | 78 (0,96)          | 45 (0,90)  | 1,18     | 0,278 | Референтний |           |
|          | A/A     | 3 (0,04)           | 5 (0,10)   |          |       | –           | –         |

Примітки: ЦД2+ДР+ДМН – група пацієнтів із ЦД2, ДР і ДМН (випадки), ЦД2 – група пацієнтів із ЦД2 (контроль), n (f) – кількість і частота пацієнтів-носіїв певного генотипу або алеля;  $\chi^2$  – критерій Пірсона з урахуванням поправки на неперервність; p – статистична значущість розбіжностей між групами; ВШ – відношення шансів; 95% ВІ – 95% вірогідний інтервал для ВШ.

**Таблиця 3.** Розподіл генотипів та алелів поліморфізму rs1927911 гена TLR4 в групах хворих за стадіями діабетичної ретинопатії (ДР)

| Генотипи | Групи хворих за стадіями ДР, n (f) |                  |                              |           |
|----------|------------------------------------|------------------|------------------------------|-----------|
|          | контроль (ДР 0)                    | 1-а (легка НПДР) | 2-а (помірна або тяжка НПДР) | 3-я ПДР   |
| G/G      | 24 (0,48)                          | 5 (0,50)         | 23 (0,70)                    | 30 (0,79) |
| G/A      | 21 (0,42)                          | 3 (0,30)         | 10 (0,30)                    | 7 (0,18)  |
| A/A      | 5 (0,10)                           | 0 (0,20)         | 0                            | 1 (0,03)  |
| p        | -                                  | >0,999           | 0,174                        | 0,036     |
| G        | 69 (0,69)                          | 13 (0,65)        | 56 (0,85)                    | 67 (0,88) |
| A        | 31 (0,31)                          | 7 (0,35)         | 10 (0,15)                    | 9 (0,12)  |
| p        | -                                  | >0,0999          | 0,087                        | 0,010     |

Примітки: n (f) – кількість і частота пацієнтів-носіїв певного генотипу або алеля; p – значущість відмінностей за критерієм  $\chi$ -квадрат з урахуванням поправки Бонфероні; НПДР – непроліферативна, ПДР – проліферативна ретинопатія.

пів (відповідно,  $\chi^2=0,52$ ;  $df=1$ ;  $p=0,471$  і  $\chi^2=1,30$ ;  $df=1$ ;  $p=0,254$ ).

Аналіз впливу генотипів виявив, що поліморфізм rs1927911 мав зв'язок із захворюванням ( $\chi^2=7,72$ ;  $p=0,021$ ). При цьому мінорна гомозигота A/A зменшували його ризик (ВШ=0,39; 95% ВІ 0,18–0,86). Відповідно, наявність алелі А також зменшувала ризик (ВШ=0,42; 95% ВІ 0,23–0,77).

Отже, наявність алелі А можна розглядати як протективний фактор розвитку очних ускладнень при ЦД2. Їх ризик у носіїв алелі А, хворих на ЦД2, був менший у 2,4 раза порівняно з носіями алелі G.

Також проведено порівняння домінантної та рецесивної моделей успадкування (табл. 2).

Розподіл генотипів rs1927911 за домінантною моделлю успадкування (G/G проти G/A+A/A) мав статистичну значущість за критерієм  $\chi^2$  Пірсона ( $\chi^2=6,38$ ;  $p=0,012$ ), тоді як розподіл генотипів за рецесивною моделлю успадкування значущим не був ( $\chi^2=1,18$ ;  $p=0,278$ ). Такий результат підтвердив наявність асоціації з очними ускладненнями в пацієнтів із ЦД2 саме за наявності в генотипі мінорної алелі А.

Таким чином, при ЦД2 поліморфізм rs1927911 мав асоціацію з розвитком таких очних ускладнень, як ДР і ДМН, маючи протективний характер.

Надалі наявність виявленого зв'язку перевірена під час стратифікації пацієнтів за стадією ДР (табл. 3) і ступенем ДМН (табл. 4).

Як впливає із цих таблиць, значущі статистичні відмінності ( $p<0,001$ ) і для генотипів, і для алелів зберігалися тільки для ПДР і ДМН 3 ступеня.

**Таблиця 4.** Розподіл генотипів та алелів поліморфізму rs1927911 гена TLR4 в групах хворих за ступенем діабетичного набряку макули (ДМН)

| Генотипи | Групи хворих за ступенем ДМН, n (f) |           |           |           |
|----------|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|          | ДМН 0                               | ДМН 1     | ДМН 2     | ДМН 3     |
| G/G      | 24 (0,48)                           | 6 (0,40)  | 12 (0,54) | 40 (0,91) |
| G/A      | 21 (0,42)                           | 6 (0,40)  | 10 (0,45) | 4 (0,09)  |
| A/A      | 5 (0,10)                            | 3 (0,20)  | 0         | 0         |
| p        | -                                   | >0,999    | 0,915     | <0,001    |
| G        | 69 (0,69)                           | 18 (0,60) | 34 (0,77) | 84 (0,95) |
| A        | 31 (0,31)                           | 12 (0,40) | 10 (0,23) | 4 (0,05)  |
| p        | -                                   | >0,999    | 0,915     | <0,001    |

Примітки: n (f) – кількість і частота пацієнтів-носіїв певного генотипу або алеля; p – значущість відмінностей за критерієм  $\chi$ -квадрат з урахуванням поправки Бонфероні.

Оцінювання зв'язку генотипів із показниками вуглеводного обміну й офтальмологічними показниками виявило деякі закономірності (табл. 5).

Статистично значуще вищим уміст у крові глюкози та глікованого гемоглобіну був за наявності ДР і ДМН у пацієнтів-носіїв генотипів G/Gi G/A (у 1,8 раза й 1,4 раза;  $p < 0,001$ ). При цьому звернув нашу увагу більший уміст обох показників у носіїв гомозиготи порівняно з гетерозиготою, що могло віддзеркалювати вплив предкової алелі G, який більшою мірою проявлявся в носіїв гомозиготи. Відповідно, наявність мінорної алелі відповідала меншим порушенням вуглеводного обміну.

Впливу генотипів на вміст глюкози та глікованого гемоглобіну за критерієм Крускал-Уолліса як за відсутністю, так і за наявністю ДР і ДМН не виявлено ( $p > 0,1$ ).

ЦТС і ЗОС за наявності ДР і ДМН були достеменно вищими від таких у пацієнтів без них у носіїв усіх генотипів (у 1,8 раза й 1,4 раза;  $p < 0,001$ ). При цьому звертав увагу суттєво (у 1,7–1,8 раз;  $p < 0,001$ ) більший уміст обох показників у носіїв дикої гомозиготи, тоді як у носіїв гетерозиготи та мінорної гомозиготи ЦТС за наявності очних ускладнень був таким самим або навіть меншим, ніж без таких.

ЗОС у носіїв гетерозиготи й мінорної гомозиготи був вищим за наявності очних ускладнень, що проявлялося меншою мірою, ніж для дикої гомозиготи. Такі дані вказували на протективний ефект щодо показників, які відбивали набряк сітківки в носіїв мутантної алелі Ars1927911.

За критерієм Крускал-Уолліса встановлено вплив генотипів на ЦТС і ЗОС у пацієнтів за наявністю ДР і ДМН ( $p < 0,001$ ). Обидва показники були нижчими в носіїв гетерозиготи й більшою мірою мінорної гомозиготи. Отже, поліморфізм rs1927911 сприяв зменшенню діабетогенного пошкодження сітківки.

Зв'язку поліморфізму rs1927911 із показниками ВОТ у цій вибірці пацієнтів не виявлено ( $p > 0,4$ ).

Однофакторний регресійний аналіз залежності ДР і ДМН від генотипів поліморфізму rs1927911 виявив наявність такого зв'язку (табл. 6).

Виявлено зниження ( $p = 0,019$ ) ризику розвитку ДР у носіїв A/G rs1927911 (ВШ=0,39; 95% ВІ 0,18–0,86) порівняно з носіями G/Grs1927911. На рисунку 2 подано криву операційних характеристик для цього тесту.

Площа під ROC-кривою, AUC=0,62 (95% ВІ 0,53–0,71), що свідчило про наявність слабого зв'язку ризику розвитку ДР із rs1927911. Під час вибору оптимального порогу (G/G rs1927911) чутливість тесту становила 71,6% (95% ВІ 60,5%–81,1%), специфічність – 52,0% (95% ВІ 37,4%–66,3%).

Таким чином, визначено, що поліморфізм rs1927911 гена TLR4 мав зв'язок із розвитком таких очних ускладнень ЦД2, як ДР і ДМН ( $p = 0,021$ ): їх ризик у носіїв алелі А зменшено (ВШ=0,42; 95% ВІ 0,23–0,77) порівняно з носіями предкової алелі G.

#### Обговорення

Отримані дані узгоджуються з даними популяції Хань, згідно з якими серед інших поліморфізмів гена TLR4 із ЦД2 був пов'язаний і rs1927911 [20].

**Таблиця 5.** Вплив генотипів поліморфізму rs1927911 гена TLR4 на показники вуглеводного обміну й офтальмологічні показники,  $M \pm SD$

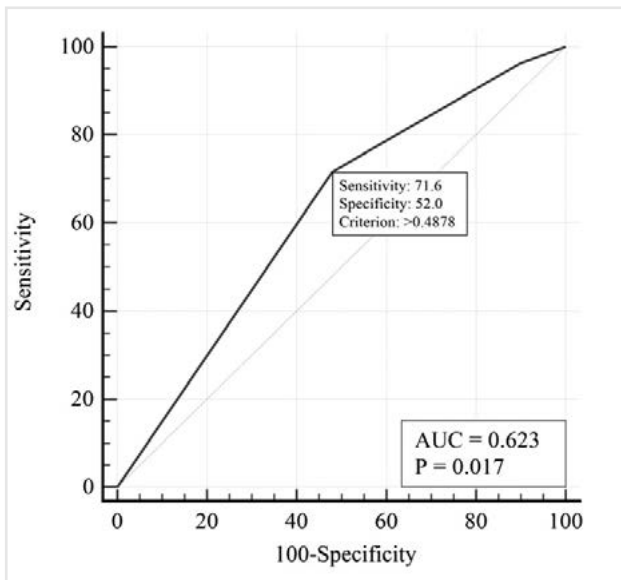
| Показник             | Група      | Генотипи    |            |            | Н    | р      |
|----------------------|------------|-------------|------------|------------|------|--------|
|                      |            | G/G         | G/A        | A/A        |      |        |
| Глюкоза, ммоль/л     | ЦД2        | 4,80±0,77   | 4,81±0,59  | 4,79±0,68  | 0,38 | 0,826  |
|                      | ЦД2+ДР+ДМН | 8,48±3,38   | 7,52±1,97  | 5,87±1,08  | 2,43 | 0,297  |
| p*                   |            | <0,001      | <0,001     | 0,099      |      |        |
| HbA1c, %             | ЦД2        | 5,42±0,36   | 5,3±0,45   | 5,38±0,43  | 1,16 | 0,558  |
|                      | ЦД2+ДР+ДМН | 7,40±0,78   | 6,96±0,66  | 6,70±0,72  | 4,53 | 0,103  |
| p*                   |            | <0,001      | <0,001     | 0,653      |      |        |
| ЦТС, мкм             | ЦД2        | 239,6±13,4  | 235,7±14,0 | 224,2±19,1 | 3,49 | 0,174  |
|                      | ЦД2+ДР+ДМН | 438,9±111,6 | 245,6±52,9 | 178,3±20,6 | 44,1 | <0,001 |
| p*                   |            | <0,001      | 0,254      | 0,036      |      |        |
| ЗОС, мм <sup>3</sup> | ЦД2        | 5,91±0,57   | 5,69±0,60  | 5,56±0,59  | 2,88 | 0,236  |
|                      | ЦД2+ДР+ДМН | 10,41±2,16  | 8,60±1,99  | 7,18±0,37  | 16,9 | <0,001 |
| p*                   |            | <0,001      | <0,001     | <0,001     |      |        |
| ВОТ, мм рт. ст.      | ЦД2        | 14,92±2,59  | 14,71±2,65 | 17,0±2,92  | 2,96 | 0,221  |
|                      | ЦД2+ДР+ДМН | 15,29±3,70  | 14,05±3,22 | 18,67±3,51 | 4,74 | 0,091  |
| p*                   |            | 0,523       | 0,609      | 0,445      |      |        |

Примітки: Н – критерій Крускала-Волліса; р – статистична значущість розбіжностей у групі; p\* – статистична значущість розбіжностей між групами (критерій Манна-Уїтні). ЦД2+ДР+ДМН – група пацієнтів із ЦД2, ДР і ДМН, ЦД2 – група пацієнтів із ЦД2.

**Таблиця 6.** Аналіз однофакторної моделі логістичної регресії ризику ДР і ДМН у носіїв різних генотипів rs1927911

| Факторна ознака |     | Коефіцієнт моделі, $b \pm m$ | Рівень значимості відмінності ВШ від 1, $p$ | Показник відношення шансів моделі, ВШ (95% ВІ) |
|-----------------|-----|------------------------------|---|--|
| rs1927911       | G/G | Референтний                  |   |  |
|                 | G/A | -0,93 $\pm$ 0,40             | 0,019                                       | 0,39 (0,18–0,86)                               |
|                 | A/A | -1,39 $\pm$ 0,77             | 0,070                                       | 0,25 (0,05–1,12)                               |

Примітки: ДР – діабетична ретинопатія, ДМН – діабетичний макулярний набряк.

**Рис. 2.** ROC-крива прогнозування ризику ДР за носійством поліморфних генотипів rs1927911.

Щодо обговорення цього факту можна зазначити, що неадекватна активація вродженої імунної системи може бути важливим фактором у патогенезі ДР [21]. TLR4 є ключовим посередником вродженого імунітету, а генетичні зміни в TLR4 підтримують запалення в умовах гіперглікемії.

Можливо, носії поліморфної мутантної алелі A/rs1927911 мають меншу схильність до розвитку прозапальних змін у сітківці, що реалізуються через патологічний ланцюг HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B [7, 8]. Гіпореактивність цієї ланки активації вродженого імунітету може бути протективним фактором розвитку очних ускладнень діабету.

Це припущення підтверджено результатами дослідження: у носіїв гетерозиготи й особливо мінорного генотипу AA порушення вуглеводного обміну та пошкодження сітківки менш виражені. Також у них знижений ризик ДР і ДМН порівняно з носіями предкового генотипу G/G (ВШ=0,37; 95% ВІ 0,18–0,76).

Таку трактовку ролі поліморфізму rs1927911 підтверджено й результатами експериментального дослідження з моделюванням ДР у мишей із нокаутом TLR4 в ендотеліальних клітинах і клітинах Мюллера

(діабетичні миші Cdh5-Cre TLR4, миші PDGFR $\alpha$ -Cre TLR4 й миші з флоксом TLR4) [22]. Глобальна втрата TLR4 зменшила діабетогенне запалення сітківки, уміст медіаторів запалення й васкулоендотеліального фактору зростання судин (VEGF), а в мишей із нокаутом TLR4 в ендотеліальних клітинах – проникність капілярів, пошкодження нейронів і судин сітківки.

Також, за даними літератури, у мишей із нокаутом TLR4 в стрептозотоциновій моделі діабету прояви ДР, зокрема товщина тканин сітківки, а також активність TLR4-залежного шляху NF- $\kappa$ B, вивільнення запальних цитокінів, експресія VEGF і гліального фібрилярного кислого білка (GFAP) були суттєво меншими [23].

Є дані, що TLR4 виявляється у стовбурових клітинах ендотелію сітківки людини, що мічені CD31, а експресія TLR4 вища у фіброваскулярних мембранах пацієнтів із ДР і в ендотеліальних клітинах судин сітківки мишей зі стрептозотоциновим діабетом [24]. Експресія TLR4 та інтерлейкіну-1 $\beta$  посилена високим рівнем глюкози в культивованих мікросудинних ендотеліальних клітинах людини, що інгібувалося нокадауном siRNA TLR4 й антагоністом TLR4.

Крім ангіогенних прозапальних ефектів, TLR4 відіграє вирішальну роль в апоптозі культивованих гангліонарних клітин сітківки (RGC) щурів, викликаному високим умістом глюкози при стрептозотоциновому діабеті [25]. Уведення антагоніста TLR4 (ТАК-242) пригнічувало запалення через чотири сигнальні шляхи TLR4 (MyD88, NF- $\kappa$ B, TRAF6, NLRP3), знижувало утворення прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-18) та апоптоз RGC.

З огляду на аналіз наведених даних, можна припустити, що активність прозапальних шляхів, які за умови гіперглікемії реалізуються через TLR4, знижена в носіїв поліморфізму rs1927911, що й зумовлює менше діабетогенне пошкодження сітківки. Безумовно, це припущення потребує експериментального підтвердження, наприклад, на культурах ендотеліальних і гангліонарних клітин сітківки в носіїв різних генотипів rs1927911. Отримані результати суттєво могли б вплинути на дослідження ефективності інгібіторів TLR4, які сьогодні активно вивчають [9–11, 25].

**Заключення.** Таким чином, нами встановлено, що поліморфізм rs1927911 гена TLR4 мав зв'язок із розвитком ДР і ДМН ( $p=0,021$ ): їх ризик у носіїв алелі А зменшено (ВШ=0,42; 95% ВІ 0,23–0,77) порівняно з носіями предкової алелі G. Розподіл генотипів

rs1927911 мав статистичну значущість за критерієм  $\chi^2$  Пірсона за домінантною моделлю успадкування (G/G проти G/A+A/A;  $p=0,012$ ; ВШ=0,37; 95% ВІ 0,18–0,76). Під час стратифікації за стадіями ДР і ДМН такий зв'язок зберігався тільки для ПДР і ДМН 3 ступеня.

Аналіз зв'язку з фенотипом пацієнтів виявив менші глікемію, уміст глікованого гемоглобіну, ЦТС і ЗОС у носіїв гетерозиготи й мінорного генотипу A/A, що відповідало меншому порушенню вуглеводного обміну й пошкодженню сітківки порівняно з носіями предкової гомозиготи G/G.

Ризик розвитку ДР у носіїв гетерозиготи G/A rs1927911 знижений ( $p=0,019$ ) порівняно з носіями предкової гомозиготи G/G (ВШ=0,39; 95% ВІ 0,18–0,86).

### Література

- 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.
- Ixamey M, Palma C. Diabetic macular edema. *Dis Mon*. 2021 May;67(5):101138.
- Rykov S, Chugayev D. Diabetic macular edema in diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus and content of L-selectin in the blood. *Ophthalmology*. *Archive of Ukrainian Ophthalmology*. 2023;11(1):24-29.
- Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 17;2:16012.
- Bayan N, Yazdanpanah N, Rezaei N. Role of toll-like receptor 4 in diabetic retinopathy. *Pharmacol Res*. 2022 Jan;175:105960.
- 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.
- Steinle JJ. Role of HMGB1 signaling in the inflammatory process in diabetic retinopathy. *Cell Signal*. 2020 Sep;73:109687.
- Nebbio M, Lambiase A, Armentano M, Tucciarone G, Bonfiglio V, Plateroti R, Alisi L. The Complex Relationship between Diabetic Retinopathy and High-Mobility Group Box: A Review of Molecular Pathways and Therapeutic Strategies. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 26;9(8):666.
- Wang Y, Tao J, Jiang M, Yao Y. Apocynin ameliorates diabetic retinopathy in rats: Involvement of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2019 Aug;73:49-56.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Гур'янов ВГ, Лях ЮЄ, Парій ВД, Короткий ОВ, Чалий ОВ, Чалий КО, Цехмістер ЯВ. Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R–statistics). Київ: Вістка. 2018:208.
- Xu Y, Jiang Z, Huang J, Meng Q, Coh P, Tao L. The association between toll-like receptor 4 polymorphisms and diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Br J Ophthalmol*. 2015 Sep;99(9):1301-5.
- 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.
- Seidel A, Liu L, Jiang Y, Steinle JJ. Loss of TLR4 in endothelial cells but not Müller cells protects the diabetic retina. *Exp Eye Res*. 2021 May;206:108557.
- Fu H, Liu H. Deletion of toll-like receptor 4 ameliorates diabetic retinopathy in mice. *Arch Physiol Biochem*. 2023 Apr;129(2):519-525.
- Wang L, Wang J, Fang J, Zhou H, Liu X, Su SB. High glucose induces and activates Toll-like receptor 4 in endothelial cells of diabetic retinopathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2015 Oct 13;7:89.
- Hu L, Yang H, Ai M, Jiang S. Inhibition of TLR4 alleviates the inflammation and apoptosis of retinal ganglion cells in high glucose. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017 Nov;255(11):2199-2210.

**Відомості про авторів та розкриття інформації**

**Відмова від відповідальності.** Автори заявляють, що висловлені у поданій статті думки є їх власними, а не офіційними позиціями установи.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Джерела підтримки:** відсутні.

Надійшла 04.10.2023