

ПОЛІМОРФІЗМ rs2149356 ГЕНА TLR4 ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ 2 ТИПУ – МОЖЛИВИЙ ЗВ'ЯЗОК З ДІАБЕТИЧНИМ МАКУЛЯРНИМ НАБРЯКОМ

Іванюта Є.П.

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

Актуальність. Відома асоціація поліморфізмів у некодуючих ділянках гена TLR4 і ризику розвитку очних ускладнень цукрового діабету 2 типу (ЦД2), при цьому деякі поліморфізми не мають зв'язку, інші збільшують ризик ускладнень, а деякі такий ризик зменшують.

Ціль: встановити зв'язок поліморфізму rs2149356 гена TLR4 з діабетичною ретинопатією (ДР) та діабетичним макулярним набряком (ДМН) при ЦД2.

Матеріали та методи. Дослідження включало 81 пацієнта (81 око) із ЦД2, у яких за настановам Американської Академії Офтальмології (2002 рік) виявлені ДР і ДМН, контрольну групу склали 50 пацієнтів (50 очей) з ЦД2, нормалізованим вуглеводним обміном, ДР 0 (ретинопатія відсутня) та відсутнім ДМН. Генотипи rs2149356 визначали методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі із застосуванням ампліфікатора Gene Amp® PCR System 7500 ("Applied Biosystems", США) та 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. У даному дослідженні не виявлено асоціації генетичного поліморфізму rs2149356 гена TLR4 з розвитком ДР та ДМН при ЦД2 ($p=0,326$). Стратифікація за стадіями ДР показала відсутність залежності розподілу генотипів, тоді як за ступенем ДМН розподіл генотипів достеменно відрізнявся при ДМН 3. Так, серед носіїв предкового генотипу G/G не зустрічалось жодного з ДМН 3, межовий рівень загального об'єму сітківки (ЗОС) склав 6,7 мм³, вище якого визначено ДМН 1 або 2. Всі носії гетерозиготи G/T мали ДМН 3, а для носіїв мінорної гомозиготи T/T визначено два межових значення ЗОС: вище за 6,7 мм³ було визначено ДМН 1 або 2, а вище за 8,7 мм³ – ДМН 3. Аналіз зв'язку поліморфізму rs2149356 TLR4 з фенотипом пацієнтів показав більші центральну товщину сітківки та ЗОС у носіїв гетерозиготи та мінорної гомозиготи T/T, що відповідало більшому пошкодженню сітківки у порівнянні з носіями предкової гомозиготи G/G ($p<0,001$).

Висновок. Отримано дані щодо зв'язку діабетогенного пошкодження сітківки з поліморфізмом rs2149356 – у носіїв алелі T набряк сітківки був більше виражений.

Ключові слова: загальний об'єм сітківки, набряк, межовий рівень.

Актуальність. Найбільш поширеними очними ускладненнями ЦД2 за даними Міжнародної діабетичної федерації та основною причиною сліпоти у дорослих працездатного віку є діабетична ретинопатія (ДР) та діабетичний макулярний набряк (ДМН) [1, 2].

У патогенезі ДР провідна роль належить запальним процесам, що запускається хронічною гіперглікемією, та приводять до активації клітинного апоптозу, нейродегенерації, окислювального стресу і неоваскуляризації [3].

Toll-подібні рецептори (TLR) розпізнають запальні чинники, зокрема продукти глікування, запалення, апоптозу та ініціюють імунних реакцій [4, 5]. Генетична схильність є одним із головних чинників, що викликають очні ускладнення ЦД2 [6, 7]. Досить добре описа-

на асоціація поліморфізмів гена TLR4 і ризику розвитку ДР, при цьому деякі поліморфізми не мають зв'язку, інші збільшують ризик, а деякі ризик ДР зменшують [8-10].

Ціль: встановити зв'язок поліморфізму rs2149356 гена TLR4 з діабетичною ретинопатією та діабетичним макулярним набряком за цукрового діабету 2 типу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

До дослідження залучено 131 пацієнт (131 око), серед яких 81 мали ЦД2, ДР та ДМН, а 50 – тільки ЦД2 (контрольна група). Вік пацієнтів склав 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 з ДР і ДМН, відповідно, – 45,7% та 54,3% ($p=0,495$). 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.

Пацієнти, що були відібрані у дане дослідження, мали ЦД2 та вперше зверталися за спеціалізованою офтальмологічною допомогою. Всім пацієнтам були виконані загальноприйнятні офтальмологічні дослідження, що включали візіометрію, рефрактометрію, тонометрію з визначенням внутрішньоочного тиску (ВОТ; 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 [11]. Всім пацієнтам виконували дослідження на оптичному когерентному томографі (ОКТ) на приладі SWEPT source OCT Triton plus (Topcon, Японія) в режимі ОКТ за протоколом сканування 3D Macula (H) 7*7 mm та 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-а ($n=10$) – з легкою непроліферативною ДР (НПДР), 2-а ($n=33$) – з помірною та тяжкою НПДР і 3-я ($n=38$) – з проліферативною ДР (ПДР). Контрольну групу склали 50 пацієнтів (50 очей) з ЦД2, нормалізованим вуглеводним обміном, ДР 0 (ретінопатія відсутня) та відсутнім ДМН.

Визначали наявність ДМН за даними наступних критеріїв оптичної томографії: перший оснований на збільшенні товщини макулярної ділянки сітківки згідно решітки ETDRS,

другий критерій визначав присутність інтраретинальної рідини на двовимірних томографічних зрізах (b-scan). Діагноз ДМН встановлювали при визначенні потовщення сітківки макулярної ділянки, що перевищували значення нормативної бази даних ОКТ, що враховували стать, вік та расу пацієнта. Збільшення товщини сітківки виражалось в перцентилях, що підсвічувалось помаранчевим та рожевим кольором по шкалі, що відповідало потовщенню сітківки в програмному забезпеченні приладу. Для аналізу допускали знімки ОКТ хорошої якості, що відповідали індексу градації якості більше 40.

Ступінь тяжкості ДМН визначали за Інтернаціональною клінічною шкалою тяжкості ДМН Американської Академії офтальмології (2003 рік): Ступеню ДМН 0 відповідали знімки сітківки з товщиною макулярної ділянки, що відповідали середньостатистичній нормі (всі 9 секторів решітки ETDRS позначалися зеленим кольором) та не фіксували наявності інтраретинальної рідини на B-scan в усіх секторах. Ступеню ДМН 1 (легкого ступеню) відповідали знімки зі збільшеною товщиною сітківки в секторах 7, 6, 8, 9 решітки ETDRS, що позначалися помаранчевим або рожевим кольором, причому в інших секторах 1-5 товщина макули відповідала нормі (маркування зеленим). За критерієм наявності інтраретинальної рідини, не визначалося її ознак в секторах 1-5. При ДМН 2 (середнього ступеню важкості) товщина макулярної ділянки була підвищена в секторах 2-5 решітки ETDRS, що позначалися помаранчевим або рожевим кольором, причому в секторі 1 товщина відповідала нормі. Критеріями відповідності ДМН 3 (важкого ступеню) було маркування рожевим кольором, що відповідало потовщенню в секторі 1. За критерієм інтраретинальної рідини, її наявність відмічалася в секторі 1. Окремо аналізували центральну товщину сітківки (ЦТС, мкм) і загальний об'єм сітківки (ЗОС, мм3).

Порушення вуглеводного обміну визначали за рівнем глюкози венозної плазми натще та вмістом у крові глікованого гемоглобіну (HbA1c).

Генотипи поліморфізму гену TLR4 rs2149356

(Chr:9.117711921; Intron TLR4) визначали методом полімеразної ланцюгової реакції у 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-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 та алелей на розвиток захворювання [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі дослідження було проведено порівнянні розподілу генотипів у пацієнтів, що були включені до даного дослідження, з

результатами Програми 1000 Genomes Project Phase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>). Визначення частот rs2149356 у Програмі 1000 Genomes було проведено у 503 осіб європейської популяції (European). Предковий генотип G/G мав частоту 0,475 (у наших дослідженнях – 0,405), гетерозигота G/T – 0,423 (у наших дослідженнях – 0,488), мутантна гомозигота T/T – 0,101 (у наших дослідженнях – 0,107); різниця статистично не значуща ($\chi^2=2,16$; $p=0,339$).

Порівнянні груп дослідження показало (рис. 1), що у пацієнтів з ДР і ДМН була відмічена тенденція до збільшення частоти мінорної гомозиготи T/T та алелі T, у порівнянні з пацієнтами що мали ЦД2 без очних ускладнень. Але ці відмінності були статистично не значущі ($p=0,349$ та $p=0,214$, відповідно).

Визначення впливу розподілу частот генотипів та алелей rs2149356 на розвиток ДР і ДМН у пацієнтів з ЦД2 показало відсутність їх асоціації з захворюванням (табл. 1).

Стратифікація пацієнтів за стадією ДР показала відсутність залежності розподілу geno-

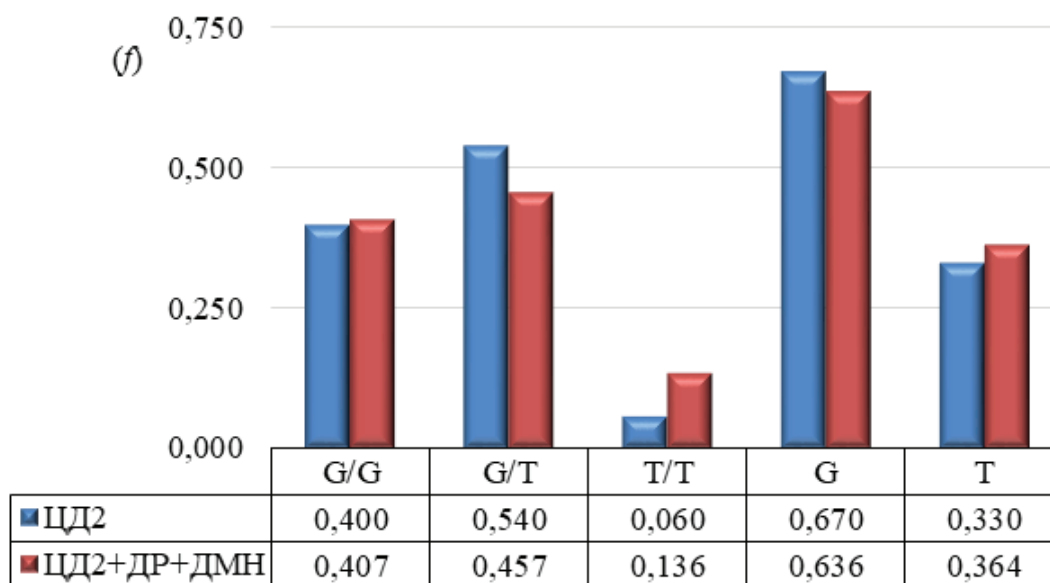


Рис. 1. Розподіл частот генотипів і алелей rs1927911 гена TLR4 у пацієнтів дослідних груп; статистична значущість за критерієм ксі-квадрат розбіжностей частот генотипів склала $p=0,349$; алелей – $p=0,214$. За вертикальною віссю – частоти (f); за горизонтальною – генотипи і алелі

Таблиця 1

**Вплив розподілу частот генотипів rs2149356 гена TLR4
на розвиток ДР і ДМН у пацієнтів з ЦД2**

Генотипи Аллелі	ЦД2Т+ДР+ДМН, n (f)	ЦД2, n (f)	χ^2	p
G/G	33 (0,407)	20 (0,400)	2,24	0,326
G/T	37 (0,457)	27 (0,540)		
T/T	11 (0,136)	3 (0,060)		
G	103 (0,636)	67 (0,670)	0,19	0,668
T	59 (0,364)	33 (0,330)		

Примітки: n – кількість; f – частота; χ^2 – критерій Пірсона з урахуванням поправки на неперервність; p – статистична значущість розбіжностей між групами.

Таблиця 2

**Розподіл генотипів та алелей поліморфізму rs2149356 гена TLR4
у групах хворих за стадіями 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	20 (0,400)	5 (0,500)	16 (0,485)	12 (0,316)
G/T	27 (0,540)	3 (0,300)	13 (0,394)	21 (0,553)
T/T	3 (0,060)	2 (0,200)	4 (0,121)	5 (0,132)
p	0,477			
G	67 (0,670)	13 (0,65)	45 (0,682)	45 (0,592)
T	33 (0,330)	7 (0,35)	21 (0,318)	31 (0,408)
p	0,663			

Примітки: n – кількість; f – частота; p – значущість відмінностей за критерієм χ -квадрат Pearson з урахуванням поправки на неперервність.

Таблиця 3

**Розподіл генотипів та алелей поліморфізму rs2149356 гена TLR4
у групах хворих за ступенем ДМН**

Генотипи	Групи хворих за ступенем ДМН, n (f)			
	ДМН 0	ДМН 1	ДМН 2	ДМН 3
G/G	20 (0,400)	13 (0,867)	20 (0,909)	0 (0,0)
G/T	27 (0,540)	0 (0,0)	0 (0,0)	37 (0,841)
T/T	3 (0,060)	2 (0,133)	2 (0,910)	7 (0,159)
p	<0,001			
G	67 (0,670)	26 (0,867)	40 (0,909)	37 (0,420)
T	33 (0,330)	4 (0,133)	4 (0,091)	51 (0,580)
p	<0,001			

Примітки: n – кількість; f – частота; p – значущість відмінностей за критерієм χ -квадрат Pearson з урахуванням поправки на неперервність.

Вплив генотипів поліморфізму rs2149356 гена TLR4 на показники вуглеводного обміну та офтальмологічні показники, $M \pm SD$ або Me ($Q_I - Q_{III}$)

Показник	Група	Генотипи			p
		G/G	G/T	T/T	
Глюкоза, ммоль/л	ЦД2	4,85 (4,425–5,5)	4,6 (4,5–5)	4,6 (4–5,35)	0,705
	ЦД2+ДР+ДМН	7,1 (5,775–8,675)	7,9 (5,7–10,925)	6,2 (5,8–7,55)	0,279
p*		<0,001	<0,001	0,024	
HbA1c, %	ЦД2	5,1 (4,9–5,65)	5,5 (5,3–5,7)	5,3 (5,15–5,375)	0,059
	ЦД2+ДР+ДМН	7 (6,25–7,825)	7,5 (7–7,85)	6,8 (6,4–7,6)	0,195
p*		<0,001	<0,001	0,014	
ЦТС, мкм	ЦД2	240,5 (228,5–249)	238,0 (224,7–246,5)	231,0 (230,25–231)	0,477
	ЦД2+ДР+ДМН	291 (232–334)	454 (356,2–509,75)	351 (289–537,25)	<0,001
p*		0,003	<0,001	0,035	
ЗОС, мм3	ЦД2	5,65 (5,3–6,2)	5,8 (5,3–6,18)	5,3 (5,2–5,52)	0,335
	ЦД2+ДР+ДМН	8,3 (7,547–8,86)	10,89 (10,08–11,903)	9,56 (8,05–13,332)	<0,001
p*		<0,001	<0,001	0,006	
ВОТ, мм рт.ст.	ЦД2	14 (13–15,5)	16 (12,5–18)	12 (11,25–14)	0,094
	ЦД2+ДР+ДМН	15 (11–17)	16 (13–19)	18 (11,5–19)	0,156
p*		0,775	0,764	0,235	

Примітки: порівняння проводилося за критерієм Крускал-Уолліса; p – статистична значущість розбіжностей у групі; p* – статистична значущість розбіжностей між групами, порівняння проводилося за критерієм Манна-Уїтні.

типів (табл. 2), тоді як при стратифікації пацієнтів та ступенем ДМН така залежність була встановлена (табл. 3).

При цьому спостерігалось збільшення частоти генотипу G/G у пацієнтів з ДМН. Проведення апостеріорних порівнянь показало відмінність розподілу за всіма генотипами пацієнтів з ДМН 0 від інших груп (p<0,05 з урахуванням поправки Бонферроні у кожному випадку).

Виявлено також відмінність розподілу за всіма генотипами пацієнтів з ДМН 3 від інших груп (p<0,05 з урахуванням поправки Бонферроні у кожному випадку). Відмінності між пацієнтами з ДМН 1 та ДМН 2 виявлено не було (p>0,05).

При порівнянні розподілу алелей проведення апостеріорних порівнянь виявило відмінність розподілу пацієнтів з ДМН 0 від ДМН 2 та ДМН 3 (p<0,05 з урахуванням поправки

Бонферроні у кожному випадку). Виявлено також відмінність розподілу за обома алелями пацієнтів з ДМН 3 від інших груп (p<0,05 з урахуванням поправки Бонферроні у кожному випадку). Відмінності між групами ДМН 1 та ДМН 2 не виявлено (p>0,05).

Також було проаналізовано зв'язок генотипів з дослідженими фенотипічними показниками (табл. 4).

Всі досліджені показники, за виключенням ВОТ, були достеменно вищими у пацієнтів з ДР та ДМН ніж без таких (p<0,05) за всіма генотипами.

За критерієм Крускал-Уолліса впливу генотипів на вміст глюкози та глікованого гемоглобіну в обох групах пацієнтів виявлено не було (p>0,05). Натомість, ЦТС та ЗОС у пацієнтів з ДР та ДМН мали зв'язок з генотипами rs2149356 (p<0,001). Обидва показника були вищими у носіїв гетерозиготи та мінорної го-

мозиготи, тобто за наявності мінорної алелі Т. (рис. 2). Виходячи з цього можна припустити, що поліморфізм rs2149356 сприяв діабетогенному пошкодженню сітківки.

У світлі отриманих результатів, дані, що представлені у таблицях 2 і 3 можуть мати і

іншу інтерпретацію. Якщо стратифікація пацієнтів за стадіями ДР не виявила будь якого зв'язку із генотипами rs2149356, то при проведенні лінійного регресійного аналізу зв'язку генотипів у пацієнтів з різним ступенем ДМН виявлені певні особливості (рис. 3).

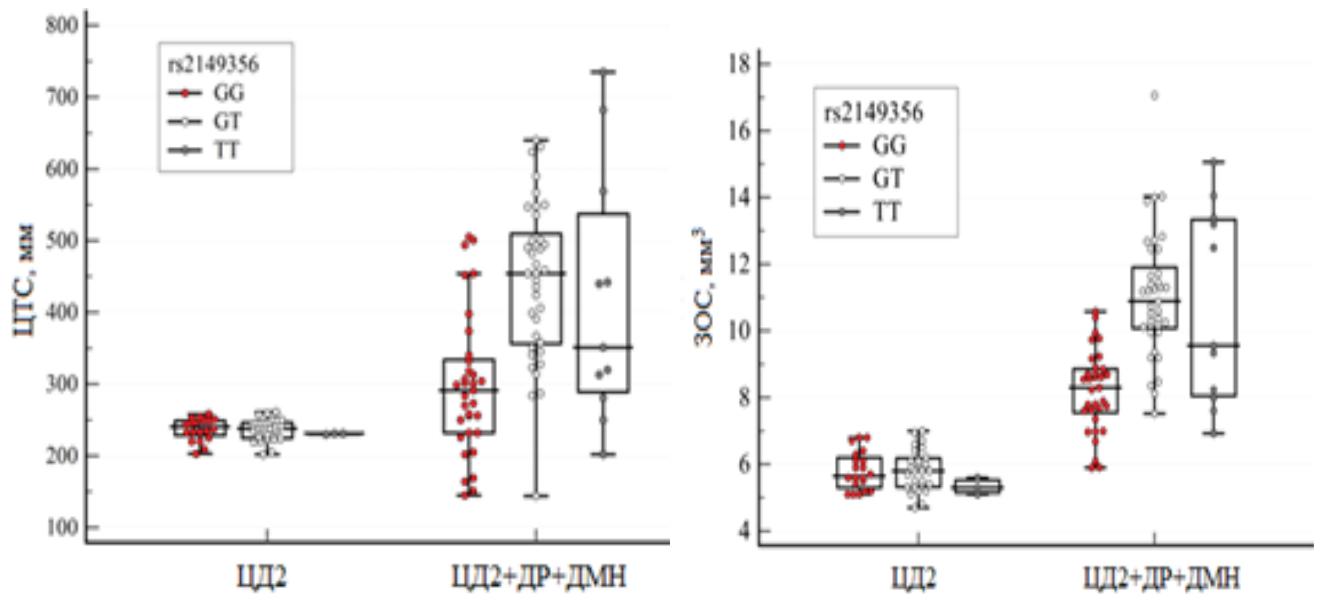


Рис. 2. Результати двохфакторного аналізу показників ЦТС (зліва) та ЗОС (справа) у пацієнтів-носіїв різних генотипів rs2149356 гена TLR4 з ЦД2 за наявності та відсутності ДР і ДМН ($p < 0,001$ для обох порівнянь). Кольорові кружечки – дані пацієнтів-носіїв відповідних генотипів; горизонтальні рисочки у прямокутниках – медіани (Me); у прямокутниках – значення I і III кватилів ($Q_I - Q_{III}$), вертикальні планки з рисками – мінімальні та максимальні значення

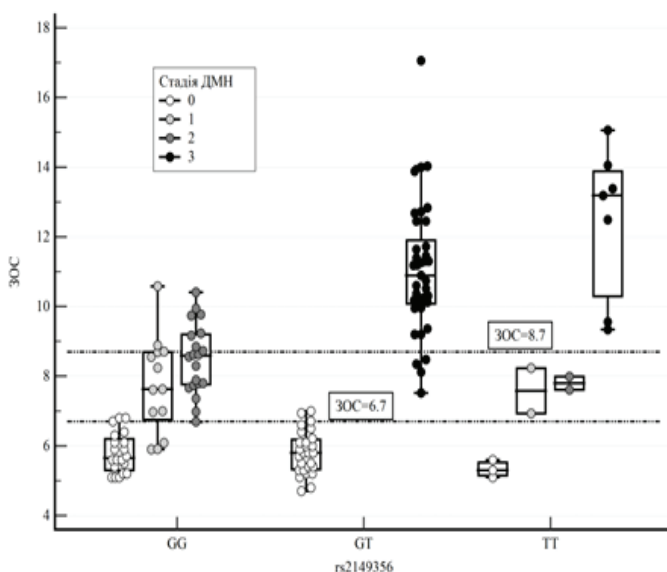


Рис. 3. ЗОС (мм^3) при ДМН різного ступеню у пацієнтів-носіїв різних генотипів rs2149356. Кружечками відповідного кольору представлені дані ЗОС у пацієнтів з різним ступенем ДМН; рисочки у прямокутниках – медіани (Me), прямокутники – I і III кватилі ($Q_I - Q_{III}$), вертикальні планки з рисками – мінімальні та максимальні значення

Для визначення ступеню ДМН можна виділити два значущих чинника – ЗОС і генотипи rs2149356. Серед носіїв генотипу G/G не зустрічалось жодного з ДМН 3 ступеню, а при значеннях ЗОС вище за 6,7 мм³ визначено ДМН 1 або 2 ступеню. Для носіїв гетерозиготи G/T навпаки не визначено жодного з ДМН 1 або 2 ступеню, а при ЗОС вище 6,7 мм³ був визначений ДМН 3 ступеню. Для носіїв мінорної гомозиготи T/T при ЗОС вище за 6,7 мм³ визначений ДМН 1 або 2 ступеню, тоді як при ЗОС більше >8,7 мм³ був визначений ДМН 3 ступеню.

Ці дані підтвердили прямий зв'язок діабетогенного пошкодження сітківки з поліморфізмом rs2149356 – набряк сітківки був більше виражений за наявності поліморфної алелі T у гетерозигот та, особливо мінорних гомозигот.

Таким чином, у даному дослідженні не підтверджена асоціація поліморфізму rs2149356 гена TLR4 з розвитком таких очних ускладнень ЦД2, як ДР та ДМН. Тенденція до збільшення частоти мінорного генотипу T/T та позитивний вплив на ЦТС і ЗОС вказували на перспективних подальших досліджень з більшою кількістю спостережень.

TLR є тригерами вроджених і адаптивних імунних відповідей, що беруть участь у патогенезі ЦД2. Чисельні одонуклеотидні поліморфізми (SNP) TLR4 (rs1927911, rs11536889, rs1927907, rs1927906, rs1927914, rs7873784 і rs2149356) і TLR2 (rs1898830, rs3804099, 96480 і rs3804100) були генотиповані у 552 осіб з ЦД2 і 552 контролів [13]. Деякі з них (rs7873784 у TLR4, rs1898830 у TLR2) були ідентифіковані як захисні проти розвитку ЦД2 а деякі (rs1927911 і rs1927914 TLR4) зв'язку з ним не мали. На думку авторів, що підтверджують і наші результати, впливом нон-місценс-поліморфізмів, розташованих у регуляторних областях TLR4 і TLR2, на розвиток ЦД2 та його ускладнень не слід нехтувати, оскільки гірші фенотипічні прояви хвороби були притаманні носіям таких поліморфізмів, зокрема, як показано нами, – rs2149356 TLR4.

Загалом вважається, що мутації TLR, які відіграють важливу роль у індукції клітин вродженого імунітету, мають супресивну роль у імунних відповідях при ЦД2, що показано для TLR-2 del -196-174 [14]. Генетичні полі-

морфізми g.13726T>C і g.15090G>A гена TLR4 потенційно пов'язані зі схильністю до ЦД2 та можуть використовуватися як молекулярні маркери для оцінки ризику ЦД2 [15].

Різнострамований характер зв'язку одиначних нуклеотидних поліморфізмів (SNP), які розташовані в генах TLR2 і TLR4, з виникненням грібкового кератиту також показано у популяції Хань [16]. Найбільши зв'язок було показано для rs10983755 TLR4, що розташований у 5'-нетрансльованій області (UTR) гена. Серед низки поліморфізмів, що розташовані у інтроні гена TLR4, з ЦД2 був найсильніше пов'язаний rs1927911 [17].

Таким чином, порушення процесів активації вродженої імунної системи через мутації генів TLR є важливим фактором патогенезу ЦД2 та його ускладнень, зокрема ДР [18]. При цьому поліморфізми не трансльованих ділянок TLR4 підтримують схильність до розвитку хронічного запалення при гіперглікемії.

Можливо припустити що носії поліморфної мутантної алелі T rs2149356 TLR4 мають більшу схильність до розвитку прозапальних змін у сітківці, що проявляється більш вираженим ДМН. Це припущення знайшло докази у даному дослідженні – у носіїв гетерозиготи і, особливо, мінорного генотипу T/T ЦТС і ЗОС були більш виражені і, крім того, мали чітку закономірність у носіїв різних генотипів – носії предкової гомозиготи не мали ДМН 3, а носії гетерозиготи – ДМН 1 і 2.

Виходячи з аналізу отриманих результатів, можна припустити, що активність прозапальних шляхів, які за умов гіперглікемії реалізуються через TLR4, збільшена у носіїв поліморфізму rs2149356 TLR4, що може сприяти більшому пошкодженню сітківки і розвитку ДМН.

ВИСНОВКИ

1. У даному дослідженні пацієнтів з ЦД2 не виявлено асоціації генетичного поліморфізму rs2149356 гена TLR4 з розвитком ДР та ДМН (p=0,326).
2. Стратифікація за стадіями ДР показала відсутність залежності розподілу генотипів, тоді як за ступенем ДМН розподіл генотипів достеменно відрізнявся при ДМН 3.

Серед носіїв предкового генотипу G/G не зустрічалось жодного з ДМН 3, межовий рівень ЗОС склав 6,7 мм³, вище якого визначено ДМН 1 або 2. Всі носії гетерозиготи G/T мали ДМН 3, а для носіїв мінорної гомозиготи T/T визначено два межових значення ЗОС: вище за 6,7 мм³ було визначено ДМН 1 або 2, а вище за 8,7 мм³ – ДМН 3.

3. Аналіз зв'язку поліморфізму rs2149356 TLR4 з фенотипом пацієнтів показав більші ЦТС і ЗОС у носіїв гетерозиготи та мінорної гомозиготи T/T, що відповідало більшому пошкодженню сітківки у порівнянні з носіями предкової гомозиготи G/G ($p < 0,001$).

Конфлікт інтересів. Автори даного рукопису стверджують, що конфлікт інтересів під час виконання дослідження та написання рукопису відсутній.

Джерела фінансування. Виконання даного дослідження та написання рукопису було виконано без зовнішнього фінансування.

REFERENCES

1. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, Bikbov MM, Wang YX, Tang Y, Lu Y, Wong IY, Ting DSW, Tan GSW, Jonas JB, Sabanayagam C, Wong TY, Cheng CY. 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.
2. Ixamey M, Palma C. Diabetic macular edema. *Dis Mon*. 2021 May;67(5):101138. DOI: 10.1016/j.disamonth.2021.101138.
3. Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Mar 17;2:16012. DOI: 10.1038/nrdp.2016.12.
4. 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
5. 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
6. Wong YH, Wong SH, Wong XT, Yap QY, Yip KY, Wong LZ, Chellappan DK, Bhattamisra SK, Candasamy M. Genetic associated complications of type 2 diabetes mellitus. *Panminerva Med*. 2022 Jun;64(2):274-288. DOI: 10.23736/S0031-0808.21.04285-3
7. Rykov S., Ziablitsev S., Mogilevskyy S., Panchenko Iu., Biliaeva O., Lavryk N. The Role of Gene Polymorphisms rs1800629 TNF α 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
8. 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
9. 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
10. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, Sidiropoulos A, Gerovassili A, Satra M, Vamvakopoulou D, Tsiopoulos F, Papanas N, Skoularigis I, Potamianos SP, Vamvakopoulos N. 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
11. 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. DOI: 10.1016/j.ophtha.2020.01.030
12. 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.
13. Huang WH, Nie LH, Zhang LJ, Jing LP, Dong F, Wang M, Zhang N, Liu Y, Zhang BH, Chen C, Lin HS, Wei XC, Yang G, Jing CX. Association of TLR2 and TLR4 non-missense single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes risk in a southern Chinese population: a case-control study. *Genet Mol Res*. 2015 Jul 31;14(3):8694-705. DOI: 10.4238/2015.July.31.18
 14. Ermiş Karaali Z, Candan G, Aktuğlu MB, Velet M, Ergen A. Toll-Like Receptor 2 (TLR-2) Gene Polymorphisms in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cell J*. 2019 Jan;20(4):559-563. DOI: 10.22074/cellj.2019.5540
 15. Lei T, Tang W, Xiong Y, Di Y, Zhang K, Shu X. Association of TLR4 gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *Int Immunopharmacol*. 2015 Jan;24(1):68-71. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.11.007
 16. Wang N, Zhao GQ, Gao A, Che CY, Qu XL, Liu Y, Guo YL. Association of TLR2 and TLR4 gene single nucleotide polymorphisms with Fungal Keratitis in Chinese Han population. *Curr Eye Res*. 2014 Jan;39(1):47-52. DOI: 10.3109/02713683.2013.827212
 17. 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. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-306677
 18. 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.

Article history:

Received: 10.07.2023

Revision requested: 21.07.2023

Revision received: 09.08.2023

Accepted: 15.09.2023

Published: 30.09.2023

TLR4 GENE POLYMORPHISM rs2149356 IN TYPE 2 DIABETES - POSSIBLE RELATIONSHIP WITH DIABETIC MACULAR EDEMA

Ivanyuta E. P.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Background. Polymorphisms in the non-coding regions of the TLR4 gene are known to be associated with the risk of ocular complications of type 2 diabetes (T2DM), with some polymorphisms having no association, others increasing the risk, and some reducing the risk of complications.

Aim: to establish the association of the TLR4 gene polymorphism rs2149356 with diabetic retinopathy (DR) and diabetic macular edema (DME) in T2DM.

Materials and methods. The study included 81 patients (81 eyes) with T2DM, in whom, according to the guidelines of the American Academy of Ophthalmology (2002), DR and DME were detected, the control group consisted of 50 patients (50 eyes) with T2DM, normalized carbohydrate metabolism, DR 0 (no retinopathy) and absent DME. Genotypes of rs2149356 were determined by real-time polymerase chain reaction using the Gene Amp® 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 this study, no association of the genetic polymorphism rs2149356 of the TLR4 gene with the development of DR and DME in T2DM was found ($p=0.326$). Stratification by stages of DR showed no dependence of the distribution of genotypes, while according to the degree of DME, the distribution of genotypes was definitely different in DME 3. Thus, among the carriers of the ancestral genotype G/G, none of DME 3 was found, the borderline level of the total retinal volume (TRV) was 6.7 mm³, above which DME 1 or DME 2 was determined. All carriers of the heterozygote G/T had DME 3, and for carriers of the minor homozygote T/T, two threshold values of TRV were determined: above 6.7 mm³, DME 1 or DME 2 was determined, and higher than 8.7 mm³ – DME 3. Analysis of the relationship between the rs2149356 TLR4 and the phenotype of patients showed greater central retinal thickness and TRV in heterozygous and minor homozygous T/T carriers, which corresponded to greater retinal damage compared to ancestral homozygous G/G carriers ($p<0.001$).

Conclusion. Data were obtained on the association of diabetic retinal damage with the rs2149356 TLR4 – retinal edema was more pronounced in carriers of the T allele.

Key words: total retinal volume, edema, threshold level.