



Н. В. Малачкова, О. М. М. Аль-Джаррах
Вінницький національний медичний університет
імені М. І. Пирогова

Роль поліморфізмів генів HTRA серинової пептидази 1, фактора росту ендотелію судин, фактора некрозу пухлин у лікуванні «вологої» форми вікової макулярної дегенерації

Вступ. Вікова макулярна дегенерація (ВМД), що уражає переважно населення середнього і старечого віку та призводить до незворотної сліпоти й втрати працездатності, є пріоритетною проблемою громадського здоров'я. З огляду на старіння європейської популяції ця проблема набуває щораз більшого значення – ризик ураження центральної частини сітківки зростає з віком, а отже, збільшується кількість хворих на ВМД [44]. До чинників, які є основою клітинного старіння і розглядаються як біологічні тригери ВМД, належать: порушення регуляції проліферації судин, дерегуляції позаклітинного матриксу, ланцюгова реакція прозапальних медіаторів, ушкодження мітохондрій з витоком мітохондріального вмісту, а також нагромадження активних форм кисню високореактивними клітинами сітківки [31]. Метаболізм ліпідів, оксидативний стрес і феномен клітинного старіння розглядаються як провокативні чинники, проте саме генетична дерегуляція цих процесів становить 46,0–71,0 % ризику виникнення захворювання [10].

Нещодавні дослідження геномних асоціацій успішно виявили множинні однонуклеотидні поліморфізми (ОНП), пов'язані зі сприйнятливістю до ВМД. Зокрема, поліморфізм гена HTRA серинової пептидази 1 (HTRA serine peptidase 1 - HTRA1) у промоторній ділянці (rs11200638 - 625 G > A), що впливає на силу експресії однойменного білка [29, 30]. Надмірна експресія гена може змінити цілісність мембрани К. Бруха, призвівши до інвазії хоріоїдальних капілярів через позаклітинний матрикс, що й відбувається за наявності «вологої» форми ВМД [28].

Неоваскуляризація зв'язана з регуляторами ангиогенезу, зокрема, фактором росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor – VEGF A). Ген VEGF A кодує родину глікопротеїнів, основна функція яких – утворення кровоносних судин *denovo* (стимулюють васкулогенез,

як у випадку ембріонального розвитку, та ангиогенез (утворення нових кровоносних судин із уже наявних судин)) через активацію клітинних сигнальних шляхів [34]. Фактор росту викликає проліферацію і міграцію ендотеліальних клітин судин і є ключовим медіатором як для фізіологічного, так і для патологічного ангиогенезу [26]. Окрім цього, VEGF бере участь у пов'язаному із системою комплементу регуляторному контурі запальної відповіді, що в разі патологічного перебігу призводить до виникнення специфічних для ВМД утворень – друз [34].

Висока насиченість ділянки макули судинами, а отже, й медіаторами запалення, привертає увагу до регулятора запальної відповіді першого порядку – фактора некрозу пухлин (tumor necrosis factor – TNF, TNF- α). Як відомо, TNF- α є цитокином із надшироким спектром функціональних властивостей, що варіюють від класичного шляху альтерації, запалення та програмованої клітинної загибелі (апоптозу) до менш традиційних міжклітинних зв'язків і комунікації в сигнальних шляхах. Мембранозв'язаний протеїн-попередник TNF- α (mTNF- α) може переходити в розчинну форму і поширюватись в організмі, зокрема, проникати в ділянку сітківки [33]. У такій формі TNF- α має надважливе значення для внутрішньоочної імунної реакції, яку називають «девіацією імунітету, пов'язаною з передньою камерою», і для авторегуляції апоптозу внутрішньоочних клітин [23].

Основна стратегія лікування «вологої» форми ВМД передбачає введення препаратів для інгібування VEGF A [10]. Однак одним із небагатьох недоліків подібного високоспецифічного методу є його висока залежність від генетичного субстрату.

Мета дослідження. Визначити роль поліморфізмів генів HTRA serine peptidase 1, vascular endothelial

growth factor A, tumor necrosis factor у лікуванні «волової» форми вікової макулярної дегенерації.

Матеріали й методи дослідження. До групи дослідження увійшли 162 особи із підтвердженням діагнозом «волової» форми ВМД, що раніше ніколи не отримували інгібітор VEGF A або не отримували anti-VEGF A упродовж чотирьох місяців і довше до початку дослідження, тоді як до групи порівняння увійшли 105 осіб, що не мали офтальмологічних хвороб у анамнезі. Під час дослідження дотримувались етичних принципів Гельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964) [42]. Кожний учасник підписав інформовану згоду на проведення дослідження. Наукова робота погоджена Комісією з біомедичної етики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова згідно з Протоколом № 6 від 17.09.2020 р.

Усіх хворих обстежували відповідно до Наказу Міністерства охорони здоров'я України № 117 «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "Офтальмологія"» від 15.03.2007 р. Характерні структурні зміни ока для визначення діагнозу волової ВМД виявляли за допомогою оптичного когерентного томографа (SOCT Copernicus "Optopol", Польща) з можливістю ангиографії у режимі з увімкненим параметром ILM-RPE (internal limiting membrane-retinal pigmented epithelium – пігментний епітелій внутрішньої межевої мембрани сітківки).

Пріоритетними для дослідження були такі ділянки оптичної когерентної томографії (ОКТ): ОКТ 2 – внутрішня верхня ділянка (innersuperior); ОКТ 3 – центральна ділянка, макула (fovea); ОКТ 4 – внутрішня нижня ділянка (inner inferior); ОКТ 7 – внутрішня назальна ділянка (inner nasal); ОКТ 8 – внутрішня скронева ділянка (inner temporal). Умовами верифікації форми ВМД як «волога» стали: хоріоїдальна неоваскуляризація крізь мембрану К. Бруха, неоваскуляризація між нею та пігментним епітелієм, неоваскуляризація в субретинальному просторі. Пацієнти отримували інтравітреальні ін'єкції Eylea із 50,0 мкл розчину, що еквівалентно 2,0 мг афліберцепту, кратністю застосування 1 раз на місяць.

Матеріал для екстракції ДНК отримували методом букального зішкробу, екстрагентом виступав реактив Chelex ® 100 Bio-Rad за застосування стандартного протоколу. Полімеразну ланцюгову реакцію у режимі реального часу (ПЛР РЧ) для виявлення одонуклеотидних поліморфізмів виконували на термоциклері-ампліфікаторі Bio-Rad CFX96 (BioRad, США) за допомогою пакета реагентів («Литех», РФ) згідно з інструкцією за замовчуванням.

Статистичний аналіз отриманих результатів виконували із застосуванням програмних пакетів Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) та SPSS 23.0. Статистичну обробку кількісних показників (гострота зору, товщина сітківки) здійснювали за допомогою середнього значення досліджуваного параметра (M) та його середньоквадратичної похибки ($\pm m$). Перевірку на нормальність розподілу кількісних показників у вибірках проводили

за критерієм S. Shapiro – M. Wilks та критерієм узгодженості А. М. Колмогорова – М. В. Смирнова з побудовою кривої К. Ф. Гауса та визначення показника p . За значень критеріїв С. С. Шапіро – М. Б. Вілка $p > 0,20$ і А. М. Колмогорова – М. В. Смирнова $p > 0,05$ показники вважали нормально розподіленими. Прогностичну значущість мутантних генотипів у виникненні резистентності до anti-VEGF A лікування з'ясували за допомогою показників відносного ризику (RR) та χ^2 , використовуючи таблиці 2x2. За $p < 0,05$ результати вважали статистично значущими.

Результати дослідження та їх обговорення. НТРА1. З метою визначення прогностичної значущості кожного окремого генотипу досліджуваного rs11200638 гена НТРА1 у виникненні в пацієнта резистентності до anti-VEGF A лікування обчислювали показники відносного ризику (RR) та χ^2 (табл. 1).

Таблиця 1

Результати визначення відносного ризику резистентності до афліберцепту за наявності генотипу rs11200638 гена НТРА serine peptidase 1

Критерій	Генотипи	RR		χ^2	p
		знач.	95% CI		
1	2	3	4	5	6
Після першої ін'єкції					
Гострота зору	GA	1,02	0,637–1,6	0,007	>0,05
	AA	1,4	0,8–2,5	1,345	>0,05
ОКТ 2	GA	0,98	0,68–1,4	0,018	>0,05
	AA	1,17	0,74–1,85	0,411	>0,05
ОКТ 3	GA	1,04	0,77–1,4	0,058	>0,05
	AA	1,07	0,7–1,62	0,104	>0,05
ОКТ 4	GA	0,97	0,72–1,3	0,042	>0,05
	AA	0,9	0,57–1,4	0,232	>0,05
ОКТ 7	GA	0,83	0,64–1,07	1,862	>0,05
	AA	0,76	0,496–1,18	1,713	>0,05
ОКТ 8	GA	0,77	0,58–1,015	3,122	>0,05
	AA	0,7	0,46–1,16	2,127	>0,05
Після останньої ін'єкції					
Гострота зору	GA	1,077	0,55–2,096	0,049	>0,05
	AA	2	0,95–4,19	3,362	>0,05
ОКТ 2	GA	1,067	0,68–1,66	0,083	>0,05
	AA	0,89	0,447–1,7	0,115	>0,05

Закінчення табл. 1

1	2	3	4	5	6
ОКТ 3	GA	1,4	0,957–2,06	3,445	>0,05
	AA	1,2	0,7–2,057	0,424	>0,05
ОКТ 4	GA	1,2	0,77–1,9	0,73	>0,05
	AA	1,06	0,55–2,04	0,029	>0,05
ОКТ 7	GA	1,12	0,75–1,68	0,333	>0,05
	AA	1	0,55–1,8	0,00	>0,05
ОКТ 8	GA	1,11	0,7–1,69	0,238	>0,05
	AA	1,16	0,65–2,056	0,244	>0,05

Примітки: Ділянки оптичної когерентної томографії: ОКТ 2 – внутрішня верхня ділянка (inner superior); ОКТ 3 – центральна ділянка, макула (fovea); ОКТ 4 – внутрішня нижня ділянка (inner inferior); ОКТ 7 – внутрішня назальна ділянка (inner nasal); ОКТ 8 – внутрішня скронева ділянка (inner temporal).

За результатами статистичного аналізу статистичного значущого впливу генотипів GG, GA та AA поліморфізму rs11200638 на виникнення резистентності до anti-VEGF А лікування не виявлено ($p > 0,05$). Як продемонстровано в табл. 1, в усіх досліджуваних параметрах результати виявились невірними, що потребує подальших досліджень.

VEGF А. Досліджуючи прогностичну значущість поліморфізму rs2010963 гена VEGF А у виникненні резистентності до anti-VEGF А лікування, отримали вірогідні результати, що продемонстровано в табл. 2.

Таблиця 2

Результати визначення відносного ризику резистентності до афліберцепту за наявності генотипу rs2010963 гена vascular endothelial growth factor А

Критерій	Генотипи	RR		χ^2	p
		знач.	95% CI		
1	2	3	4	5	6
Після першої ін'єкції					
Гострота зору	GC	1,01	0,656–1,88	0,003	>0,05
	CC	1,64	1,02–2,64	3,62	>0,05
ОКТ 2	GC	1,37	0,95–1,996	2,861	>0,05
	CC	2,5	1,83–3,5	21,29	<0,001
ОКТ 3	GC	1,38	1,02–1,88	4,45	<0,05
	CC	2,15	1,6–2,8	18,24	<0,001

Закінчення табл. 2

1	2	3	4	5	6
ОКТ 4	GC	1,23	0,9–1,656	1,79	>0,05
	CC	1,6	1,18–2,256	6,351	<0,05
ОКТ 7	GC	1,25	0,93–1,68	2,26	>0,05
	CC	1,99	1,5–2,58	15,926	<0,001
ОКТ 8	GC	1,17	0,856–1,6	0,986	>0,05
	CC	1,95	1,478–2,57	13,792	<0,001
Після останньої ін'єкції					
Гострота зору	GC	1,37	0,7–2,67	0,881	>0,05
	CC	3,9	2,13–7,1	19,24	<0,001
ОКТ 2	GC	2,7	1,556–4,8	14,107	<0,001
	CC	6,1	3,66–10,27	51,29	<0,001
ОКТ 3	GC	2,09	1,4–3,09	15,321	<0,001
	CC	3,47	2,45–4,9	35,888	<0,001
ОКТ 4	GC	2,9	1,7–5,03	18,92	<0,001
	CC	4,9	2,9–8,29	35,822	<0,001
ОКТ 7	GC	2,06	1,3–3,24	10,871	0,001
	CC	3,8	2,5–5,75	33,608	<0,001
ОКТ 8	GC	2,6	1,6–4,12	19,539	<0,001
	CC	4,23	2,7–6,556	36,842	<0,001

Примітка. Див. примітки до табл. 1.

Після першої ін'єкції статистично значущі результати фіксували у носіїв генотипу CC ($p < 0,05$), що вказує на найбільший ризик наявності резистентності до афліберцепту, принаймні, на перших етапах лікування. Зокрема, найбільший відносний ризик спостерігали у ділянці макули у пацієнтів із гомозиготним варіантом за мінорним алелем цей показник становив 2,15 рази ($RR = 2,15$; 95% CI 1,6–2,8). Водночас високі показники χ^2 у носіїв генотипу CC незалежно від зони ОКТ ($p < 0,05$), імовірно, свідчать про вплив rs2010963 гена VEGF А на всі обрані в дослідженні ділянки сітківки та дозволяє впевненіше використовувати його як прогностичний чинник резистентності до афліберцепту.

Після останньої ін'єкції вірогідну прогностичну значущість rs2010963 гена VEGF А на резистентність до лікування спостерігали в обох мутантних геноти-

пах незалежно від досліджуваного параметра органа зору ($p < 0,001$). Виняток становили лише результати RR у випадку оцінки гостроти зору в носіїв гетерозиготи ($p > 0,05$), що можна пояснити відсутністю впливу цього алельного варіанта на її поліпшення. Серед носіїв генотипу GC найвищі значення відносного ризику спостерігали, аналізуючи ділянки ОКТ 2 (RR = 2,7; 95% CI 1,556–4,8), ОКТ 4 (RR = 2,9; 95% CI 1,7–5,03) та ОКТ 8 (RR = 2,6; 95% CI 1,6–4,12). Водночас у пацієнтів – носіїв гомозигот за мінорним алелем найбільші показники RR також були зареєстровані в цих ділянках, проте значно переважали результати у гетерозиготних пацієнтів.

Отже, отримані результати, імовірно, свідчать про першочерговий вплив rs2010963 саме на ці ділянки сітківки, а пересічні показники відносного ризику та χ^2 серед усіх досліджуваних ділянок вказують на виражений ступінь асоціації цього поліморфізму з резистентністю до афліберцепту.

TNF. Завдяки визначенню відносного ризику серед даних ОКТ також з'ясовано статистично значущий вплив генотипів GA й AA поліморфізму rs1800629 на резистентність пацієнтів до VEGF-лікування ($p < 0,05$), що продемонстровано в табл. 3.

Таблиця 3

Результати визначення відносного ризику резистентності до афліберцепту за наявності генотипу rs1800629 гена tumor necrosis factor

Критерій	Генотипи	RR		χ^2	p
		знач.	95% CI		
1	2	3	4	5	6
Після першої ін'єкції					
Гострота зору	GA	1,5	0,93–2,5	3,071	>0,05
	AA	2,18	1,089–4,4	3,896	<0,05
ОКТ 2	GA	1,78	1,167–2,7	8,775	<0,01
	AA	2,1	1,175–3,8	4,61	<0,05
ОКТ 3	GA	1,7	1,193–2,45	10,86	0,001
	AA	2,23	1,446–3,4	7,7	<0,01
ОКТ 4	GA	1,7	1,182–2,5	10,091	0,001
	AA	2,6	1,75–3,8	11,8	0,001
ОКТ 7	GA	1,4	1,019–1,9	5,027	<0,05
	AA	1,88	1,264–2,8	5,508	<0,05
ОКТ 8	GA	1,77	1,218–2,56	11,5	0,001
	AA	2,078	1,26–3,4	5,476	<0,05
Після останньої ін'єкції					
Гострота зору	GA	1,5	0,77–3,03	1,531	>0,05
	AA	4,2	2–8,98	12,596	<0,001

1	2	3	4	5	6
ОКТ 2	GA	1,37	0,84–2,2	1,715	>0,05
	AA	2,7	1,567–4,7	8,814	<0,01
ОКТ 3	GA	1,3	0,9–1,9	2,503	>0,05
	AA	2,13	1,395–3,3	7,1	<0,01
ОКТ 4	GA	1,87	1,1–3,18	6,382	<0,05
	AA	3,77	2,17–6,58	15,728	<0,001
ОКТ 7	GA	1,5	0,99–2,4	4,148	<0,05
	AA	2,9	1,77–4,7	11,457	0,001
ОКТ 8	GA	1,9	1,17–3,175	7,893	<0,01
	AA	3,1	1,7–5,59	10,605	0,001

Примітка. Див. примітки до табл. 1.

Найбільший вплив гетерозиготного варіанта на резистентність до лікування після першої ін'єкції спостерігали у ділянках ОКТ 2 (RR = 1,78; 95% CI 1,1–3,18) і ОКТ 8 (RR = 1,77; 95% CI 1,218–2,56), а високі значення χ^2 (8,775 ($p < 0,01$) і 11,5 ($p = 0,001$)) відповідно свідчили про вірогідний зв'язок між цим алельним варіантом і резистентністю цих ділянок сітківки до дії афліберцепту. При цьому після останньої ін'єкції найвищі значення RR були зареєстровані у ділянках ОКТ 4 (RR = 1,77; 95% CI 1,218–2,56) і ОКТ 8 (RR = 1,9; 95% CI 1,17–3,175), що свідчить про найбільший ризик неефективного лікування препаратами anti-VEGF А за наявності rs1800629 GA саме у цих ділянках, тоді як в ОКТ 2 та ОКТ 3 результати виявилися невірогідними ($p > 0,05$), що потребує подальших досліджень.

Водночас усі значення відносного ризику серед генотипу AA були статистично значущими ($p < 0,05$) і вищими, ніж показники у пацієнтів із гетерозиготою та диким типом поліморфізму. Наприклад, у ділянці ОКТ 4 відносний ризик резистентності до лікування після першої ін'єкції становив 2,6 разу (RR = 2,6; 95% CI 1,75–3,8), а в ділянці жовтої плями – 2,23 разу (RR = 2,23; 95% CI 1,446–3,4). Однак після останньої ін'єкції найвищі значення RR спостерігали в ділянках ОКТ 4 (RR = 3,77; 95% CI 2,17–6,58) і ОКТ 8 (RR = 3,1; 95% CI 1,7–5,59), що, зважаючи на показники χ^2 (15,728 ($p < 0,001$) і 10,605 ($p = 0,001$)) відповідно, вказує на виражену прогностичну значущість генотипу AA і резистентності хворих з ВМД до дії препаратів anti-VEGF А у цих ділянках сітківки.

Проте, аналізуючи вплив алельних варіантів на гостроту зору, вірогідність результатів виявили лише у випадку оцінки генотипу AA ($p < 0,001$), за наявності якого відносний ризик резистентності зростав у 2,18

разу (RR = 2,18; 95% CI 1,089–4,4) після першої ін'єкції та в 4,2 разу (RR = 4,2; 95% CI 2–8,98) після завершення лікування. Водночас у пацієнтів із генотипом GA результати були невірогідні ($p > 0,05$).

Сучасні дослідження визначають судинну дисфункцію хороїдальної оболонки сітківки як критичний пункт у патогенезі ВМД [14]. Тому вивчення механізмів регуляції ангиогенезу та впливу на них перебуває у фокусі науково-дослідних груп. Наприклад, після публікації двох успішно завершених клінічних випробувань anti-VEGF A лікування у 2006 р. використання цього методу значно поширилося, а журнал "Science" навіть вніс цей тип біологічного лікування до списку десяти найважливіших наукових проривів року [2]. Наразі anti-VEGF A є пріоритетним методом лікування. Так, у 2016 р. понад 690 000 учасників програми Medicare Part B отримали майже 3 млн інтравітреальних ін'єкцій проти VEGF A [3]. Загальний механізм дії anti-VEGF A лікарських засобів полягає у блокуванні VEGF A.

Окремо розглядаючи клінічний вплив інгібіторів VEGF A на «вологі» форми вікової макулярної дегенерації, можна зробити висновок про дію переважно через зменшення проникності судин, а не через пригнічення біологічного чинника – це залишає простір для варіабельності результатів лікування [36]. При цьому широка доступність anti-VEGF A лікування суттєво змінила поширеність «вологої» ВМД і дала змогу впливати на неї, хоча результати досліджень за оцінкою ефективності за реальних умов значно відрізнялися від проведених раніше клінічних випробувань [34]. Певна варіабельність у результатах лікування «вологої» форми ВМД перебуває під невивченим впливом генетичних поліморфізмів. Так, генетичний профіль, імовірно, робить свій внесок у варіативність терапевтичної відповіді. За іншою інформацією, до 20,0 % пацієнтів після повного курсу лікування далі втрачають зір, хоч і застосовують комбіновані терапевтичні схеми антагоністів VEGF A. Це дає змогу припустити регуляторний вплив інших факторів, зокрема однонуклеотидних поліморфізмів [14], які прямо (ген VEGF A (rs2010963)) або опосередковано (гени HTRA1 (rs11200638) і TNF (rs1800629)) пов'язані з патогенезом ВМД.

HTRA1 (rs11200638). Ген HTRA1 міститься на 10-й хромосомі, у локусі 10q26.13 та кодує однойменний протеїн, який через інгібування TGF- β здатен модулювати ангиогенез, створюючи опосередкований вплив на ефективність anti-VEGF A. Подібні закономірності виявлено у популяціях північного Китаю, Індії, Ізраїлю та Польщі [29]. Різні генотипи HTRA1 були пов'язані з варіабельними результатами лікування, а пацієнти з алелем ризику мали здебільшого гіршу реакцію на лікування та потребували меншої кількості ін'єкцій для досягнення результатів [24]. Зокрема, повідомляється, що поліморфізм rs11200638 (також відомий як 625A/G) може призвести до змін транскрипційної активності й впливати на нормальну активність білків, які змінюють чутливість до таких препаратів,

як ранізумаб, бевацизумаб [29]. Також гірший візуальний результат спостерігали після лікування ранібізумабом або бевацизумабом саме у хворих із мутантним типом промотору HTRA1 [11, 46].

Дослідники відзначали неоднорідність результатів лікування навіть за умови цього поліморфізму – інколи не виявляли відмінностей у розподілі поліморфізму між позитивними та негативними респондентами, хоча носіння генотипу ризику частіше траплялося у тих, хто показував гірший результат [9]. Деякі дослідження вказували на варіабельну відповідь пацієнтів із ВМД на anti-VEGF A лікування за наявності HTRA1-625A/G, при цьому вчені вагалися щодо специфічності цього впливу, беручи до уваги також форму захворювання, супутні хвороби та особливості застосовуваних лікарських засобів [11, 46]. Наше дослідження також не виявило статистично значущих фармакогенетичних асоціацій між поліморфізмом rs11200638 у гені HTRA1 і відповіддю на лікування афліберцептом, що залишає наукову дискусію стосовно цього питання відкритою.

VEGF A (rs2010963). Ген VEGF A входить до генної мережі PDGF/VEGF з великою кількістю про- і антиангіогенних чинників. Кодуюча ділянка розташовується у локусі 6p21.1, а в разі активації продукує білкову полімерну структуру завдовжки 232 амінокислоти з молекулярною масою 27042 Да [17]. VEGF A кодує гепаринзв'язувальний білок – VEGF, який існує у вигляді гомодимеру з дисульфідним зв'язком. Його функцією є активація проліферації та міграції ендотеліальних клітин судин – одна з основних ланок патогенезу «вологої» ВМД [27, 37]. А поліморфізм rs2010963 (також відомий як +405G/C), розташований у 5'-нетрансльованій ділянці гена, підвищує синтез VEGF, результатом чого є неоваскуляризація у сітківці. При цьому утворена стінка судин більш крихка, що зрештою призводить до крововиливів та різкої втрати зору [5].

На вплив VEGF A +405G/C на виникнення «вологої» форми ВМД у європейській популяції вперше вказали К. Janik-Papis із колегами, які виявили асоціацію ОНП із виникненням хвороби (OR 2.90, 95% CI 1,89–4,48) [22]. С. Huang зі співавторами не виявили статистично значущого зв'язку між поліморфізмом гена VEGF A та виникненням неоваскуляризації у сітківці. Водночас автори зауважили більшу схильність (на 54,0 %) до тяжких форм ВМД у пацієнтів європеїдної раси з генотипом CC, залишаючи відкритим дискусійне питання про вплив поліморфізму rs2010963 на виникнення та перебіг ВМД [20].

У контексті впливу ОНП на резистентність до лікування сучасні дослідження також мають контрверсійні результати. Наприклад, І. Nabibi зі співавторами вказують на гіршу відповідь на лікування афліберцептом серед пацієнтів із мутантним генотипом поліморфізму +405G/C порівняно з пацієнтами з диким типом, тоді як D. Imai з колегами не знайшли статистично значущої різниці у лікуванні пацієнтів залежно від генотипу rs2010963 [18, 21]. У нашому дослідженні результати

вказують на виражений вплив поліморфізму на резистентність до застосування афліберцепту як у представників гетерозиготного генотипу, так і у хворих із мутантним генотипом CC ($p < 0,05$). Причиною цього явища може бути виникнення фармакодинамічної толерантності до anti-VEGF A лікування, описаної в дослідженні S. Binder [4]. Учений з'ясував, що резистентність до лікування виникає через підвищену експресію VEGF A і/або його рецепторів, що й відбувається за наявності поліморфізму rs2010963. Проте неоднозначність результатів досліджень може вказувати на наявність інших патогенетичних механізмів резистентності до афліберцепту, що потребує подальших досліджень [18, 21]. Окрім цього, досі є дискусійною «зона залежності» виявленого впливу, яку ми спостерігали, аналізуючи результати. Ця особливість не була описана в інших працях, тому може бути темою для подальших наукових напрацювань.

TNF (rs1800629). Ген TNF міститься на короткому плечі 6-ї хромосоми у локусі 6p21.33 в ділянці, що кодує III клас основного комплексу гістосумісності, та має довжину 2772 азотисті основи [12, 16]. Продукт гена – TNF- α – виробляють макрофаги у відповідь на інфекцію та запальне подразнення [33]. Він здатен взаємодіяти зі специфічними рецепторами TNFR1 і TNFR2, які є сайтами зв'язування для активації імунних клітин з метою поширити запалення [13, 15, 40]. Поліморфізм rs1800629 (також відомий як G-308A) локалізований у промоторній ділянці гена TNF перед ініціатором транскрипції, на 308 нуклеотиді [1]. У цьому положенні аденін змінюється на гуанозин, що призводить до зростання активності прозапального маркера TNF- α [45]. Як наслідок, ген TNF є пов'язаним із цілим спектром запальних і аутоімунних захворювань [25, 32, 38]. Окрім цього, на прикладі російської популяції V. Chernykh зі співавторами продемонстрували зв'язок G-308A з виникненням ВМД [8]. Інші вчені заперечують асоціацію між ОНП rs1800629 та виникненням «вологої» форми ВМД серед представників китайської та іранської популяцій [6, 39]. Отримані результати досліджень можна пов'язати з етнічними відмінностями.

Описуючи зв'язок TNF та ВМД, вчені беруть за основу здатність макрофагів посилювати окиснювальне ушкодження, ангіогенез і запалення, завдяки чому

модуляція експресії гена TNF потенційно може мати терапевтичне значення в контексті хвороби [35]. Автори також зазначають, що TNF- α може індукувати експресію VEGF з пігментного епітелію сітківки, відіграючи потенційну роль у anti-VEGF A лікуванні [35]. Інші науковці стверджують, що ін'єкції anti-VEGF A лікарських засобів знижують експресію TNF- α у сітківці у хворих із «вологою» формою ВМД [19]. Оскільки цей різновид лікування призводить до інгібування утворених цитокинів, зокрема TNF- α , можна припустити, що механізм є ефективним унаслідок дії на поліморфізми VEGF A і TNF.

Існують гіпотези щодо впливу поліморфізму G-308A на механізм резистентності до anti-VEGF A лікування. Вони полягають у тому, що TNF- α діє на «цитокіновий каскад», який відіграє важливу роль у виникненні запального процесу [13]. Унаслідок цього дія anti-VEGF A лікування є недостатньою для створення суттєвого ефекту [41]. В. Busbee зі співавторами показали інший імовірний механізм, що лежить в основі виникнення резистентності до anti-VEGF A лікування, однак це твердження потребує створення практичного підґрунтя [7]. Згідно з ним відбуваються структурні ушкодження стінок судин унаслідок хронічного запалення в результаті хоріоїдної неоваскуляризації. Це призводить до тривалої ексудації разом із аномальною проникністю судинної стінки, що не піддається впливу anti-VEGF A лікування [43].

Висновки. За результатами дослідження визначено статистично значущий вплив поліморфізмів vascular endothelial growth factor A (rs2010963) і tumor necrosis factor (rs1800629) у виникненні резистентності до афліберцепту ($p < 0,05$), що пов'язано насамперед із патогенетичним впливом на систему ангіогенезу в організмі, зокрема в очах. Водночас розбіжність показників RR і 95% CI у різних ділянках сітківки вказує на нерівнозначний вплив мутантних генотипів цих одонуклеотидних поліморфізмів на різні ділянки сітківки. Попри контрверсійність результатів досліджень щодо впливу rs11200638 гена HTRA serine peptidase 1 на гіршу відповідь у випадку anti-vascular endothelial growth factor A лікування, достовірних результатів, аналізуючи роль цього генотипу, не виявлено ($p > 0,05$), що може бути темою для подальших наукових досліджень.

Список літератури

1. Ahmed R, Sharif D, Jaf M, Amin DM. Effect of TNF- α -308G/A (rs1800629) promoter POLYMORPHISM on the serum level of TNF- α among iraqi patients with generalized Vitiligo. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2020;13:825-835. <https://doi.org/10.2147/CCID.S272970>
2. American Association for the Advancement of Science. The Runners-Up. Science. 2006;314:1850-1855. <https://doi.org/10.1126/science.314.5807.1850a>
3. Bauml CR. Wet age-related macular degeneration: treatment advances to reduce the injection burden. Am J Manag Care. 2020;26(5 Suppl):S103-S111. <https://doi.org/10.37765/ajmc.2020.43435>
4. Binder S. Loss of reactivity intravitreal anti-VEGF therapy: tachyphylaxis and tolerance? Br J Ophthalmol. 2012;96(1):1-2. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2011-301236>
5. Blasiak J, Watala C, Tuuminen R, Kivinen N, Koskela A, Uusitalo-Järvinen H et al. Expression Of VEGFA-regulating miRNAs and mortality wet J Cell Mol Med. 2019;23(12):8464-8471. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14731>
6. Bonyadi MHJ, Bonyadi M, Ahmadi H, Fotuhi N, Shoeibi N, Saadat S et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in advanced non-exudative age-related macular degeneration. J Ophthalmic Vis Res. 2015;10(2):155-159. <https://doi.org/10.4103/2008-322X.163781>

7. Busbee BG, Ho AC, Brown DM, Heier JS, Suñer IJ, Li Z et al. Twelve-month efficacy and safety of 0.5 mg or 2.0 mg ranibizumab in patients with subfoveal neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2013;120(5):1046-1056. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.10.014>
8. Chernykh V, Shevchenko A, Kononov V, Prokofiev V, Eremina A, Trunov A. TNF- α gene polymorphisms: association with age-related macular degeneration in Russian population. *Int J Ophthalmol*. 2019;12(1):25-29.
9. Cruz-Gonzalez F, Cabrillo-Estevez L, Rivero-Gutierrez V, Sanchez-Jara A, DeJuan-Marcos L, Gonzalez-Sarmiento R. Influence of CFH, HTRA1 and ARMS2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet age-related macular degeneration in a Spanish population. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(9):1304-1309.
10. Deng Y, Qiao L, Du M, Qu C, Wan L, Li J et al. Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes Dis*. 2022;9(1):62-79. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.02.009>
11. Díaz-Villamarín X, Blánquez-Martínez D, Pozo-Agundo A, Pérez-Gutiérrez AM, Muñoz-Ávila JJ, Antúnez-Rodríguez A et al. Genetic variants affecting anti-vegf drug response in polypoidal choroidal vasculopathy patients: a systematic review and meta-analysis. *Genes (Basel)*. 2020;11(1335):1-13. <https://doi.org/10.3390/genes11111335>
12. El-Tahan RR, Ghoneim AM, El-Mashad N. TNF- α gene polymorphisms and expression. *Springer Plus*. 2016;5(1508):1-7. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3197-y>
13. Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun*. 2010;11:27-60. <https://doi.org/10.1159/000289196>
14. Farnoodian M, Wang S, Dietz J, Nickells RW, Sorenson CM, Sheibani N. Negative regulators of angiogenesis: Important targets for treatment of exudative AMD. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(15):1763-1780. <https://doi.org/10.1042/CS20170066>
15. Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015(610813):1-18. <https://doi.org/10.1155/2015/610813>
16. GeneCards - the human gene database. TNF gene - geneCards; 2005. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF>.
17. GeneCards - the human gene database. VEGFA gene - geneCards; 2005. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VEGFA>.
18. Habibi I, Kort F, Sfar I, Chebil A, Bouraoui R, Abdallah TB et al. Effect of Risk Alleles in CFH, C3, and VEGF A on the response to intravitreal bevacizumab in Tunisian patients with neovascular age-related macular degeneration. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2016;233(4):465-470. <https://doi.org/10.1055/s-0041-111801>
19. Hachana S, Fontaine O, Sapiéha P, Lesk M, Couture R, Vaucher E. The effects of anti-VEGF and kinin B1 receptor blockade on retinal inflammation in laser-induced choroidal neovascularization. *Br J Pharmacol*. 2020;177(9):1949-1966. <https://doi.org/10.1111/bph.14962>
20. Huang C, Xu Y, Li X, Wang W. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms and age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Mol Vis*. 2013;19:1211-1221.
21. Imai D, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Awata T, Inoue S et al. CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration. *J Ocul Biol Dis Infor*. 2010;3(2):53-59. <https://doi.org/10.1007/s12177-010-9055-1>
22. Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol*. 2009;87(3):234-238. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.09.005>
23. Jiang Q, Li Z, Tao T, Duan R, Wang X, Su W. TNF- α in uveitis: from bench to clinic. *Front Pharmacol*. 2021;12(740057):1-13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.740057>
24. Kang HK, Yoon MH, Lee DH, Chin HS. Pharmacogenetic influence of LOC387715/HTRA1 on the efficacy of bevacizumab treatment for age-related macular degeneration in a Korean population. *Korean J Ophthalmol*. 2012;26(6):414-422. <https://doi.org/10.3341/kjo.2012.26.6.414>
25. Khaloo P, Qahremani R, Rabizadeh S, Omid M, Rajab A, Heidari F et al. Nitric oxide and TNF- α are correlates of diabetic retinopathy independent of hs-CRP and HbA1c. *Endocrine*. 2020;69:536-541. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02353-x>
26. Lin F, Wang P, Chuang Y, Wang J, Wong VHY, Bui BV et al. Gene therapy intervention in neovascular eye disease: a recent update. *Mol Ther*. 2020;28(10):2120-2138. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.06.029>
27. Liu B, Wei J, Li M, Jiang J, Zhang H, Yang L et al. Association of common genetic variants in VEGFA with biliary atresia susceptibility in North western Han Chinese. *Gene*. 2017;628:87-92. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.027>
28. Lotery A, Trump D. Progress in defining the molecular biology of age related macular degeneration. *Hum Genet*. 2007;122(3-4):219-236. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0406-3>
29. Mohamad NA, Ramachandran V, Isa HM, Chan YM, Ngah NF, Ching SM et al. Association of HTRA1 and ARMS2 gene polymorphisms with response to intravitreal ranibizumab among neovascular age-related macular degenerative subjects. *Hum Genomics*. 2019;13(13):1-12. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0197-3>
30. Nakanishi H, Gotoh N, Yamada R, Yamashiro K, Otani A, Hayashi H et al. ARMS2/HTRA1 and CFH polymorphisms are not associated with choroidal neovascularization in highly myopic eyes of the elderly Japanese population. *Eye*. 2010;24:1078-1084. <https://doi.org/10.1038/eye.2009.215>
31. Nashine S. Potential therapeutic candidates for age-related macular degeneration (AMD). *Cells*. 2021;10(2483):1-16. <https://doi.org/10.3390/cells10092483>
32. Passan S, Goyal S, Bhat MA, Singh D, Vanita V. Association of TNF- α gene alterations (c.-238G>A, c.-308G>A, c.-857C>T, c.-863C>A) with primary glaucoma in north Indian cohort. *Gene*. 2019;709:25-35. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.035>
33. Pinci F, Gaidt MM, Jung C, Kuut G, Jackson MA, Bauernfried S, Hornung V. C-tag TNF: A reporter system to study TNF shedding. *J Biol Chem*. 2020;295(52):18065-18075. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015248>
34. Ricci F, Bandello F, Navarra P, Staurengi G, Stumpp M, Zarbin M. Neovascular age-related macular degeneration: therapeutic management and new-upcoming approaches. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8242):1-40. <https://doi.org/10.3390/ijms211218242>

35. Rinsky B, Hagbi-Levi S, Elbaz-Hayoun S, Grunin M, Chowers I. Characterizing the effect of supplements on the phenotype of cultured macrophages from patients with age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2017;23:889-899. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.11.018>
36. Stahl A. The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration. *Dtsch Arztebl Int.* 2020;117(29-30):513-520. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0513>
37. Stefano JE, Bird J, Kyazike J, Cheng AW, Boudanova E, Dwyer M et al. High-affinity VEGF antagonists by oligomerization of a minimal sequence VEGF-binding domain. *Bioconjug Chem.* 2012;23(12):2354-2364. <https://doi.org/10.1021/bc300301m>
38. Stepp MA, Menko AS. Immune responses to injury and their links to eye disease. *Transl Res.* 2021;236:52-71. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.05.005>
39. Wan L, Lin H, Tsai Y, Lee C, Tsai F et al. Tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Retina.* 2010;30(10):1595-1600. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3181dc58a6>
40. Wei X, Chen Y, Wu L, Cui L, Hu D, Zeng X. Tumor necrosis factor- α G-308A (rs1800629) polymorphism and aggressive periodontitis susceptibility: a meta-analysis of 16 case-control studies. *Sci Rep.* 2016;6(19099):1-8. <https://doi.org/10.1038/srep19099>
41. Woo HJ, Yu C, Kumar K, Gold B, Reifman J. Genotype distribution-based inference of collective effects in genome-wide association studies: in sights to age-related macular degeneration disease mechanism. *BMC Genomics.* 2016;17(695):1-20. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2871-3>
42. World Medical Association. Ethical principles for medical research involving human subjects. 2018; WMA declaration of Helsinki. Available from: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
43. Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:1857-1867. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97653>
44. Zacks DN, Kocab AJ, Choi JJ, Gregory-Ksander MS, Cano M, Hand JT. Cell death in AMD: the rationale for targeting fas. *J Clin Med.* 2022;11(592):1-14. <https://doi.org/10.3390/jcm11030592>
45. Zhang Y, Cao Y, Xin L, Gao N, Liu B, Li Y. Association between rs1800629 polymorphism in tumor necrosis factor- α gene and dilated cardiomyopathy susceptibility. *Medicine.* 2018;97(50):e13386. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013386>
46. Zhou Y, Chen C, Wang Y, Tong Y, Fang X, Li L et al. Association between polymorphism rs11200638 in the HTRA1 gene and the response to anti-VEGF treatment of exudative AMD: a meta-analysis. *BMC Ophthalmology.* 2017;17(97):1-9. <https://doi.org/10.1186/s12886-017-0487-2>

Стаття надійшла до редакції журналу 13.12.2022 р.

Конфлікт інтересів

Автори цієї статті стверджують, що конфлікту інтересів немає.

Роль поліморфізмів генів HTRA серинової пептидази 1, фактора росту ендотелію судин, фактора некрозу пухлин у лікуванні «вологої» форми вікової макулярної дегенерації

Н. В. Малачкова, О. М. М. Аль-Джаррах

Вступ. Мультифакторіальність вікової макулярної дегенерації (ВМД) погіршує клінічну ефективність сучасних методів лікування, однак дослідження поліморфізмів перспективне для вдосконалення та розробки ефективніших стратегій лікування.

Мета. Визначити роль поліморфізмів генів HtrA серинової пептидази 1 (HTRA serine peptidase 1 - HTRA1), фактора росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor – VEGF A), фактора некрозу пухлин (tumor necrosis factor – TNF) у лікуванні «вологої» форми вікової макулярної дегенерації.

Матеріали й методи. Обстежено 162 особи з діагнозом «вологої» форми ВМД, які отримували anti-VEGF A лікування упродовж шести місяців і яким виконували оптичну когерентну томографію (ОКТ), полімеразну ланцюгову реакцію у режимі реального часу. Для статистичного аналізу отриманих результатів застосовували набір програмних пакетів Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) та SPSS 23.0.

Результати. Найбільшу прогностичну значущість у пацієнтів як із генотипом TC, так і з CC rs2010963 гена VEGF A зареєстровано в результаті аналізу ділянки ОКТ 2, ОКТ 4 та ОКТ 8, що свідчить про виражений вплив поліморфізму на виникнення резистентності до anti-VEGF A лікування. Аналізуючи rs1800629 ген TNF, найбільшу прогностичну значущість для генотипу GA фіксували в ділянках ОКТ 4 і ОКТ 8, а для генотипу AA – у ділянках ОКТ 4, ОКТ 8. Оцінюючи ОНП rs11200638 гена HTRA1, статистично значущих результатів не виявили ($p > 0,05$).

Висновки. Результати дослідження свідчать про безпосередній вплив поліморфізмів vascular endothelial growth factor A (rs2010963) і tumor necrosis factor (rs1800629) на лікування, проте вивчення цього впливу за наявності rs11200638 гена HTRA serine peptidase 1 потребує подальших досліджень.

Ключові слова: вікова макулярна дегенерація, афліберцепт, ген, поліморфізм, HTRA1, VEGF A, TNF.

The Role of HTRA Serine Peptidase 1, Vascular Endothelial Growth Factor A, Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms in the Treatment of Wet Age-Related Macular Degeneration

N. Malachkova, O. M. M. Al-Jarrah

Introduction. Age-related macular degeneration (AMD) of the retina is still considered the leading cause of vision loss in the elderly. The multifactoriality of the disease impairs the clinical effectiveness of modern AMD treatment methods. However, the study of single-nucleotide polymorphisms, in particular, of the HTRA serine peptidase 1 (HTRA1), vascular endothelial growth factor A (VEGF A) and tumor necrosis factor (TNF) genes is a promising link on the way to improve and develop more effective treatment strategies of the disease.

The aim of the study. To investigate the role of HTRA 1, VEGF A and TNF gene polymorphisms in the treatment of wet age-related macular degeneration.

Materials and methods. 162 people with diagnosed wet AMD took part in the investigation. They received anti-VEGF A therapy in the form of injections of aflibercept monthly for half a year. Structural changes of the eyes were studied using optical coherence tomography (OCT); polymerase chain reaction (PCR) studies were performed using a Bio-Rad CFX 96 apparatus (BioRad, USA) using a reagent package (Lytech, Russia). Statistical analysis of the obtained results was performed using a set of software packages Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) and SPSS 23.0.

Results. It was revealed that the best prognostic significance in patients with the TC rs2010963 genotype of the VEGFA gene was registered during the analysis of OCT 2 (RR = 2.7; 95% CI 1.556 – 4.8), OCT 4 (RR = 2.9; 95% CI 1.7 – 5.03) and OCT 8 (RR = 2.6; 95% CI 1.6 – 4.12) sections, while in patients with the CC genotype these indicators in the OCT 2 section were: RR = 6.1; 95% CI 3.66 – 10.27; in OCT zone 4 RR=4.9; 95% CI 2.9 – 8.29, and in the OCT section 8: RR = 4.23; 95% CI 2.7 – 6.556, which indicates a more pronounced influence of the CC genotype. When analyzing rs1800629 of the TNF gene, the best prognostic significance of the GA genotype was established in the OCT 4 (RR = 1.77; 95% CI 1.218 – 2.56) and OCT 8 (RR=1.9; 95% CI 1.17 – 3.175) areas ($p < 0.05$), with the AA genotype in OCT 4 (RR = 3.77; 95% CI 2.17 – 6.58), OCT 8 (RR = 3.1; 95% CI 1.7 – 5.59) zones and when evaluating changes in visual acuity of patients with wet AMD (RR = 4.2; 95% CI 2 – 8.98). No statistically significant results were found in the evaluation of the HTRA1 gene rs11200638 ($p > 0.05$).

Conclusions. The data obtained in our study indicate a direct influence of the vascular endothelial growth factor A (rs2010963) and tumor necrosis factor (rs1800629) polymorphisms on the emergence of resistance to aflibercept. However, the study of this influence in the presence of the HTRA serine peptidase 1 gene rs11200638 requires further research.

Keywords: age-related macular degeneration, aflibercept, gene, polymorphism, HTRA1, VEGFA, TNF.

Відомості про авторів

1. Малачкова Наталія Валентинівна; Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, кафедра очних хвороб (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56; +38(0432)57-03-60); кандидатка медичних наук, професорка, завідувачка кафедри; +38(067)452-75-40, malachkovanataliia@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-7899-379X>
2. Осама Мохаммад Мітеб Аль-Джаррах; Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, кафедра очних хвороб (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56; +38(0432)57-03-60); аспірант кафедри; +38(063)160-37-74) dr.osama.aljarrah@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9174-9508>