

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова
Міністерства охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех

УДК: 617.736-07-037:616-036.1:575

ДИСЕРТАЦІЯ

**Ефективність новітніх методів прогнозування розвитку вікової
макулярної дегенерації на підставі клінічних та біомолекулярних зв'язків**

Галузь знань 22 «Охорона здоров'я» 222 – «Медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех

Науковий керівник: Малачкова Наталія Валентинівна, кандидат медичних
наук, професор

Вінниця – 2023

АНОТАЦІЯ

Маса'дех М. М. Ефективність новітніх методів прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації на підставі клінічних та біомолекулярних зв'язків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 – Медицина. Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2023.

Дисертація присвячена підвищенню ефективності, діагностики та прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації, шляхом визначення ролі факторів ризику та генетичного поліморфізму генів-кандидатів (rs1800629 гена TNF, rs1061170 гена CFH і rs11200638 гена HTRA1) у її виникненні та прогресуванні у мешканців Подільського регіону України.

Вікова дегенерація жовтої плями (вікова макулярна дегенерація) – це захворювання, яке швидко прогресує та вражає переважно людей літнього віку і являє собою одну з найпоширеніших причин втрати зору. Більш ніж за 150 років досліджень наукова спільнота пройшла шлях від опису проявів патології (ідентифікації друз як основного морфологічного маркера нозології) до детальних класифікацій і визначення ролі генетичних детермінант в етіопатогенезі захворювання. За рахунок високої специфічності та можливості превентивного аналізу у галузі генетичної діагностики очних хвороб даний метод потребує уваги спеціалістів дослідницьких груп.

У США вікова макулярна дегенерація спричиняє близько 54 % важкої втрати зору у європеїдній раси, 14 % в латиноамериканців та 4 % у афроамериканців. Дана патологія частіше проявляється в осіб, які старше 50 років. У Великобританії значне порушення зору через вікову макулярну

дегенерацію трапляється у 4 % пацієнтів старше 75 років, а 14 % у осіб старше 90 років.

На сьогодні дослідження генетичних маркерів при розвитку вікової макулярної дегенерації і особливостей їх взаємодій має велике значення. Кожен з них проявляє гетерогенність щодо впливу окремих алельних комбінацій, тому на даний час актуальним буде визначення сили зв'язку між виникненням та прогресуванням окремих форм вікової макулярної дегенерації та генотипом поліморфізмів в осіб з даною патологією.

Усі дослідження проведені з дотриманням основних біоетичних норм та вимог Гельсінської декларації. Було обстежено 291 пацієнта. В ході виконання дослідження були використані: клініко-анамнестичні, офтальмологічні, молекулярно-генетичні та статистичні методи дослідження.

У процесі наукового дослідження виявлено асоціацію однонуклеарних поліморфізмів rs11200638 гена HTRA1 з розвитком ВМД. Носійство мінорної алелі А підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2,88 разів, а «вологої» – в 2.43 рази. Носійство генотипу GA збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 6,84 разів, а «вологої» – у 1.88 рази. Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) підвищує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.39 рази, а «вологої» форми ВМД у 13.30 рази.

За результатами аналізу було виявлено асоціацію однонуклеарного поліморфізму rs1061170 гена CFH з розвитком ВМД. Носійство мінорної алелі С підвищує шанси виникнення «сухої» форми захворювання у 2,31 рази, а «вологої» – у 3,96 рази. Носійство гетерозиготного генотипу (ТС) підвищує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 1.98 рази, а «вологої» – у 1.35 рази. Водночас генотип СС збільшує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.84 рази, а «вологої» – у 7.56 рази.

Встановлено асоціацію однонуклеарного поліморфізму rs1800629 гена TNF з розвитком вікової макулярної дегенерації. Носійство мінорної алелі А підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2.39 рази, а «вологої» – в 2.74 рази. Носійство гетерозиготного варіанту поліморфізму (GA) підвищує ризик виникнення «сухої» форми ВМД у 2.68 рази, а неоваскулярної форми – у 4.05 рази. Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) збільшує шанс виникнення «сухої» форми патології у 2.90 рази, а «вологої» – у 2.24 рази.

З'ясовано асоціацію комбінацій генотипів поліморфізмів rs1800629 гена TNF – rs1061170 гена CFH – rs11200638 гена HTRA1 з розвитком ВМД. Статистично значущий зв'язок із «сухою» формою ВМД був виявлений для 4 комбінацій генотипів, G/A-C/C-G/A, G/A-T/T-G/A ($p=0,005$), G/A-T/C-G/A ($p<0,001$). З ризиком розвитку «вологої» форми ВМД була виявлена асоціація з 4 комбінаціями генотипів: G/A-C/C-G/A, G/A-C/C-G/G, G/G-T/C-G/A, G/A-T/C-G/A.

Вперше серед мешканців подільського регіону України було виявлено комбінації генотипів (TNF rs1800629 – CFH rs1061170 – HTRA1 rs11200638), для носіїв трьох комбінацій генотипів було виявлено значний протективний вплив щодо ризику розвитку обох форм ВМД, зокрема:, G/A-T/T-G/G , G/G-T/T-G/G та G/G-T/T-G/A. Причому носійство двох останніх комбінацій мало найбільший протективний вплив щодо ризику розвитку «вологої» форми. Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «сухої» форми ВМД мали комбінації генотипів G/A-C/C-G/A, G/A-T/C-G/A та G/A-T/T-G/A. Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «вологої» форми ВМД мала комбінація генотипів G/A-C/C-G/A.

Отримані в роботі дані про розподіл генотипів та їх сполучень за дослідженими однонуклеотидними поліморфізмами в популяції Подільського

регіону України можуть бути використані в якості референтних при дослідженні молекулярних основ генетичної схильності до вікової макулярної дегенерації.

Результати аналізу прогностичного значення досліджених алельних варіантів та їх сполучень щодо ризику розвитку та перебігу вікової макулярної дегенерації можуть бути використані при формуванні груп підвищеного ризику з метою прийняття своєчасних профілактичних заходів, спрямованих на зниження частоти вікової макулярної дегенерації в популяції Подільського регіону України.

Комплексна оцінка алельного поліморфізму зазначених генів у пацієнтів з віковою макулярною дегенерацією дозволить прогнозувати перебіг захворювання, що буде сприяти зниженню рівня інвалідизації хворих.

Ключові слова: вікова макулярна дегенерація, сітківка ока, прогнозування якості життя, поліморфізм гена TNF- α , поліморфізм гена CFH, поліморфізм гена HTRA1, цитогенетика, однонуклеотидний поліморфізм, біомаркер, предиктори ризику, поліморфні алелі, оптична когерентна томографія, генетика, макулярні зміни, поліморфізм.

ABSTRACT

Masa'deh M. M. The effectiveness of the latest methods for predicting the development of age-related macular degeneration based on clinical and biomolecular relationships. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Thesis for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of study 22 Health care by specialty 222 Medicine . National Pirogov Memorial Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsia, 2023.

The dissertation is devoted to increase the efficiency of diagnosis and prognosing of age-related macular degeneration by determining the role of risk factors and genetic polymorphism of candidate genes (TNF, HTRA1, CFH) in its occurrence and progression in patients in Ukraine.

Age-related macular degeneration (AMD) affects mostly the elderly people and is one of the most common causes of rapidly progressive vision loss. For more than 150 years of research, the scientific community has gone from understanding the macroscopic picture of the lesion (identification of drusen as the main morphological manifestation of nosology) to detailed classifications and determining the role of genetic determinants in the etiopathogenesis of the disease — it is early diagnosis by genetic analysis that requires the greatest attention of specialized research groups due to high specificity and many unexplained in the field of genetic diagnosis of eye diseases.

In the United States, age-related macular degeneration causes about 54 % of severe vision loss (the better eye sees worse than 0.1) in the white population, 14 % in Hispanics, and 4 % in blacks. Prevalence increases with age and symptoms are less common in people under 50 years of age. In the UK, significant visual impairment due to age-related macular degeneration occurs in 4 % of patients over the age of 75, and 14 % of people over the age of 90.

Till this day, the study of genetic markers in the development of age-related macular degeneration and the features of their interactions has a great importance. Each of them shows heterogeneity with regard to the influence of individual allelic combinations, therefore explore relationship between the occurrence/progression of individual forms of age-related macular degeneration and the genotype of selected polymorphisms among individuals with this pathology are relevant in our time.

All studies were conducted in compliance with the basic bioethical norms and requirements of the Declaration of Helsinki. 291 patients were examined. During research, we used the following clinical anamnestic, ophthalmological, molecular genetic and statistical research methods.

In the process of scientific research, the association of single-nuclear polymorphisms rs11200638 of the HTRA1 gene with the development of AMD was revealed. Carrying the minor allele A increases the chance of the "dry" form of the disease by 2.88 times, and the "wet" form by 2.43 times. Heterozygote (GA) genotype increases the risk of developing "dry" AMD by 6.84 times, and "wet" by 1.88 times. Homozygous carrier of the minor allele (AA) increases the chance of developing the "dry" form of AMD by 2.39 times, and the "wet" form of AMD by 13.30 times.

According to the results of the analysis, an association of the single-nuclear polymorphism rs1061170 of the CFH gene with the development of AMD was revealed. Carrying the minor C allele increases the chances of the "dry" form of the disease by 2.31 times, and the "wet" form by 3.96 times. Carrying the heterozygous genotype (TC) increases the risk of developing the "dry" form of AMD by 1.98 times, and the "wet" form by 1.35 times. Homozygote CC genotype increases the chance of the "dry" form of AMD by 2.84 times, and the "wet" form by 7.56 times.

The association of the polymorphism rs1800629 of the TNF gene with the development of age-related macular degeneration was established. Carrying the minor allele A increases the chance of the "dry" form of the disease by 2.39 times, and the "wet" form by 2.74 times. Carrying the heterozygous polymorphism variant (GA) increases the risk of the occurrence of the "dry" form of AMD by 2.68 times, and the neovascular form - by 4.05 times. The homozygous carrier of the minor allele (AA) increases the chance of developing the "dry" form of pathology by 2.90 times, and the "wet" form by 2.24 times.

The association of genotype combinations of polymorphisms rs1800629 of the TNF gene - rs1061170 of the CFH gene - rs11200638 of the HTRA1 gene with the development of AMD was found. A statistically significant association with the "dry" form of AMD was found for 4 combinations of genotypes, G/A-C/C-G/A, G/A-T/T-G/A ($p=0.005$), G/A-T/C-G/A ($p<0.001$). An association with the risk of developing "wet" AMD was found with 4 combinations of genotypes: G/A-C/C-G/A, G/A-C/C-G/G, G/G-T/C-G/A, G/A-T/C-G/A.

For the first time, a combination of genotypes (TNF rs1800629 – CFH rs1061170 – HTRA1 rs11200638) was detected among residents of the Podillya region of Ukraine, a significant protective effect was detected for carriers of three combinations of genotypes with regard to the risk of developing both forms of AMD: G/A-T/T-G/G, G/G-T/T-G/G and G/G-T/T-G/A. Moreover, the last two combinations had the greatest protective effect on the risk of developing a "wet" form. The greatest prognostic significance regarding the risk of "dry" AMD was the combination of genotypes G/A-C/C-G/A, G/A-T/C-G/A and G/A-T/T-G/A. The combination of G/A-C/C-G/A genotypes had the greatest prognostic significance regarding the risk of "wet" AMD.

The data obtained in the work on the distribution of genotypes and their combinations according to the investigated single-nucleotide polymorphisms in the

population of the Podillya region of Ukraine can be used as a reference in the study of the molecular basis of genetic predisposition to age-related macular degeneration.

The results of the analysis of the prognostic value of the studied allelic variants and their combinations regarding the risk of development and course of age-related macular degeneration can be used in the formation of high-risk groups in order to take timely preventive measures aimed at reducing the frequency of age-related macular degeneration in the population of Ukraine.

A comprehensive assessment of the allelic polymorphism of these genes in patients with age-related macular degeneration will allow predicting the course of the disease, which will contribute to reducing the level of disability of patients.

Key words: Age-related macular degeneration, retina, predicting quality of life, TNF- α gene polymorphism, CFH gene polymorphism, HTRA1 gene polymorphism, cytogenetics, single nucleotide polymorphism, biomarker, risk factors, polymorphic alleles, optical coherence tomography, genetics, macular changes, polymorphism.

Список публікацій здобувача :**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Малачкова Н. В., Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех (2022). Вивчення взаємодій між поліморфізмом гена CFH та фенотипом пігментного епітелію сітківки при віковій дегенерації макули. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(3), 369-375

2. Malachkova, N. V., Mohammad Mashhour Mohammad Masa'deh (2022). Investigation of the effect of TNF- α on damage to retinal pigment epithelial cells in age-related macular degeneration. Reports of Morphology, 28(1),34-41.

3. Малачкова Н. В., Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех (2022). Вивчення взаємодій між поліморфізмом гена HTRA1 та фенотипом пігментного епітелію сітківки при віковій дегенерації макули. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(2), 260-266.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

4. Малачкова, Н. В., Маса'дех, М. М. М., Аль-Джаррах, О. М. М., Людкевич, Г. П., Сухань, Д. С. (2021). Сучасний погляд на етіопатогенез вікової макулярної дегенерації та роль молекулярно-генетичних детермінант у ньому. Архів офтальмології України, № 3, 2021, (22-28).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. Малачкова, Н.В, Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад (2022). Вивчення ролі комбінації певних генотипів у виникненні та перебігу вікової макулярної дегенерації. *Scientific Collection «InterConf»*, (127) : 1st ISPC «Modern Directions and Movements in Science» (October 6-8, 2022; Luxembourg, Grand Duchy of Luxembourg)., С 178–180.

6. Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад, Малачкова Н. В. (2022). Зв'язок між поліморфізмом гена CFH та віковою макулярною дегенерацією. *Scientific Collection «InterConf»*, (130). 1st International Scientific and Practical Conference «Science and Education in Progress» (October 26-28, 2022; Dublin, Ireland)., С 255–256.

7. Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад, Малачкова Н. В. (2022). Зв'язок між поліморфізмом гена TNF та віковою макулярною дегенерацією. *Scientific Collection «InterConf»*, (128). 13th ISPC «Science and Practice: Implementation to Modern Society» (October 16-18, 2022; Manchester, Great Britain)..,С 182–183.

Зміст

ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1	
СУЧАСНІ АСПЕКТИ ДІАГНОСТИКИ ТА ПАТОГЕНЕЗУ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ: РОЛЬ ГЕНЕТИЧНИХ ЧИННИКІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	
1.1 Статистичні дані поширеності вікової макулярної дегенерації	25
1.2 Етіологія і патогенез вікової макулярної дегенерації: сучасні дані.....	26
1.3 Генетичні аспекти розвитку ВМД.....	28
РОЗДІЛ 2	
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	36
2.1 Дизайн дослідження і клінічна характеристика хворих	36
2.2 Офтальмологічні дослідження	37
2.3 Генетичні дослідження	42
2.4 Методи статистичної обробки	48
РОЗДІЛ 3	
ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ rs11200638 ГЕНА HTRA1 З РОЗВИТКОМ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ.....	49

3.1 Розподіл генотипів та частота алелей поліморфних варіантів rs11200638 гена HTRA1 у пацієнтів з ВМД та в групі порівняння.....	49
3.2 Аналіз асоціації поліморфізму rs11200638 гена HTRA1 з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації (без врахування форми захворювання).....	53
3.3. Аналіз асоціації поліморфізму rs11200638 гена HTRA1 з ризиком розвитку «сухої» і «вологої» форм вікової макулярної дегенерації.....	55

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ rs1061170 ГЕНА CFH З РОЗВИТКОМ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ.....	62
---	-----------

4.1 Розподіл генотипів та частота алелей поліморфних варіантів поліморфізму rs1061170 гена CFH у пацієнтів з ВМД та в групі порівняння.....	62
4.2 Аналіз асоціації поліморфізму rs1061170 гена CFH з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації.....	65
4.3. Аналіз асоціації поліморфізму rs1061170 гена CFH з ризиком розвитку «сухої» і «вологої» форм вікової макулярної дегенерації.....	68

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ rs1800629 ГЕНА TNF З РОЗВИТКОМ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ.....	74
--	-----------

5.1 Розподіл генотипів та частота алелей поліморфних варіантів rs1800629 гена TNF у пацієнтів з ВМД та в групі порівняння.....	74
5.2 Аналіз асоціації поліморфізму rs1800629 гена TNF з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації	77

5.3. Аналіз асоціації поліморфізму rs1800629 гена TNF з ризиком розвитку «сухої» і «вологої» форм вікової макулярної дегенерації.....	79
---	----

РОЗДІЛ 6

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ КОМБІНАЦІЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ CFH (rs1061170), HTRA1 (rs11200638) ТА TNF (rs1800629) З РОЗВИТКОМ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ.....	85
---	-----------

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	94
ВИСНОВКИ.....	110
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	113
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	114
ДОДАТКИ	137

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- AUC – Area under the ROC curve (площа під ROC-кривою)
- CFH – Complement Factor H (фактор комплементу H)
- CFI – Complement Factor I (фактор комплементу I)
- HTRA1 – High-Temperature Requirement A Serine Peptidase 1 (HtrA серинова пептидаза 1)
- VEGF – Vascular endothelial growth factor (фактор росту ендотелію судин)
- OR, ВШ – odds ratio (відношення шансів)
- ROC-крива – Receiver Operating Characteristic curve analysis (метод аналізу кривих операційних характеристик)
- TNF – Tumor Necrosis Factor (фактор некрозу пухлин)
- χ^2 – критерій хі-квадрат
- ВМД – вікова макулярна дегенерація
- ОНП, SNP – однонуклеотидний поліморфізм
- ПЛР- РЧ – полімеразно-ланцюгова реакція у режимі реального часу
- С – специфічність
- Ч – чутливість
- 95% ДІ – 95% confidence interval (95% довірчий інтервал)
- СНМ – субретинальна неоваскулярная мембрана
- ПЕС – пігментний епітелій сітківки
- МКХ-10 – міжнародна класифікація хвороб 10 перегляду
- ОКТ – оптична когерентна томографія

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Вікова дегенерація жовтої плями (вікова макулярна дегенерація, ВМД) є мультифакторіальним захворюванням із порушенням функції комплементу, регуляції ліпідного обміну, розладами у запальних та репараційних механізмах та ангіогенними розладами [1, 2, 101, 103]. Всесвітня організація охорони здоров'я у рамках звіту World Report on Vision (2019) презентувала дані про прогнози щодо можливої кількості осіб з ВМД до 2030 року. За результатами, які були отримані за допомогою методу моделювання виявлено, що кількість хворих на усі форми ВМД зросте з 195,6 мільйони до 243,4 мільйони за період 2020-2030 років, що робить вікову макулярну дегенерацію не тільки третьою за питомою вагою у структурі офтальмологічних хвороб, після міопії та пресбіопії, але і першою за темпами поширення у світі [102]. Думки клініцистів щодо класифікації ВМД виражено у ряді наукових консенсусів, що дійшли загальної домовленості: ВМД – це повільнопрогресуюче захворювання, яке проходить від ранньопрогресуючої до проміжної й, зрештою, до пізньої стадії. Остання охоплює неоваскулярну ВМД (для якої характерна хоріоїдна неоваскуляризація) або географічну атрофію. Це викликає швидке погіршення зору, спровоковане загибеллю фоторецепторних клітин [113, 114].

Фактори ризику ВМД можуть бути широко класифіковані на ендогенні фактори (вік, стать, раса/етнічна приналежність, спадковість та соціально-економічний статус, колір райдужної оболонки, оптична щільність макулярного пігменту, дермальна еластична дегенерація та потужність антиоксидантних систем) та фактори навколишнього середовища (наприклад, шкідливі звички, зокрема паління та вживання алкоголю, вплив ультрафіолетового випромінювання, харчування, яке включає недостатність в раціоні мікроелементів та дієтичне споживання риби, соціально-економічний статус

людини) [104]. Головним фактором ризику розвитку даного захворювання є вік (поширеність захворювання складає 24 % в осіб віком від 65 до 74 років, проти більш ніж 44 % в осіб віком від 70 до 95 років в німецькій популяції) та паління (у курців відношення шансів розвитку ВМД вище у 2,6-4,8 рази у порівнянні з некурцями) [106]. За даними сучасних досліджень ключову роль у розвитку ВМД грають генетичні детермінанти, при цьому розподіл поширеності поліморфізмів вказує на етнічну структуру патології, демонструючи наявність асоційованих з ВМД патологічних алелей, з вищим відсотком у представників європеоїдної (39 %), афроамериканської (30 %), та значно меншим відсотком прояву у представників азіатської раси (7 %) [107].

Точна патофізіологія ВМД залишається недосконало вивченою – феномен клітинного старіння призводить до змін проникності мембрани Бруха та в подальшому накопиченні у сітківці ока продуктів обміну, які мають вигляд друзів – однією з основних ознак даної патології. [105]. Апоптоз, піроптоз (загибель клітин, що залежить від каспази-1), а також некроптоз (регульований некроз, залежний від білків RIPK3 і MLKL, незалежний від каспази) можуть бути залучені до загибелі клітин пігментного епітелію, пов'язаної з ВМД [108, 109]. Наукові дослідження останніх років свідчать про те, що різноманітні поліморфізми відіграють ключову роль у розвитку даної патології. Найбільш вагомими серед них є CFH (регулятор системи комплементу, через який опосередковується запальна реакція у відповідь на дегенеративні процеси), MMP (сімейство матричних металопротеїназ, що впливають на оксидативний стрес клітин), HTRA1 (регулятор структури позаклітинного матриксу), TNF (запальний медіатор першого порядку, що опосередковує клітинну загибель), C3 (фракція комплементу запальної фази), VEGF (фактор росту епітелію, що впливає на розвиток неоваскуляризації), CYP2J2 (представник сімейства оксидоредуктаз, інгібітор перекисного окиснення мембранних білків) [109, 110,

111, 112]. Ми обрали поліморфізми rs1800629 гена TNF – rs1061170 гена CFH – rs11200638 гена HTRA1 як структурно та топологічно віддалені, але функціонально пов'язані ефекторні точки в призмі патогенезу ВМД.

В Україні дослідження зв'язку поліморфізму генів rs1800629 TNF - rs1061170 гена CFH – rs11200638, гена HTRA1 з ВМД не проводилися. Даний факт обумовив вибір генів-кандидатів для подальшого дослідження в роботі та визначення зв'язку з ризиком розвитку ВМД.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є складовою частиною планової науково-дослідної роботи (НДР) НДР кафедри очних хвороб Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова МОЗ України за темою: «Мультидисциплінарний підхід до діагностики, лікування та профілактики захворювань органу зору травматичного, інфекційного, дегенеративного характеру на клітинному рівні», № державної реєстрації 0117U003119 і виконана відповідно плану наукових досліджень ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Дисертант є співвиконавцем вказаної тематики НДР.

Мета дослідження: Підвищити ефективність діагностики та прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації шляхом визначення генотипів однонуклеотидних поліморфізмів та комплексу офтальмо-діагностичних заходів.

Завдання дослідження:

Дослідити асоціацію однонуклеотидного поліморфізму rs11200638 гена HTRA1 з ризиком розвитку «сухої» та «вологої» форм вікової макулярної дегенерації.

Прослідкувати можливу асоціацію однонуклеотидного поліморфізму

rs1061170 гена CFH з з ризиком розвитку «сухої» та «вологої» форм вікової макулярної дегенерації.

Дослідити асоціацію однонуклеотидного поліморфізму rs1800629 гена TNF з ризиком розвитку «сухої» та «вологої» форм вікової макулярної дегенерації.

Провести аналіз наявності взаємозв'язку між розвитком вікової макулярної дегенерації та комбінаціями генотипів поліморфних варіантів однонуклеотидного поліморфізмів rs1800629, rs1061170 та rs11200638.

Визначити комбінації генотипів поліморфних варіантів ОНП rs1800629, rs1061170 та rs11200638 при яких існує найвищий ризик розвитку «сухої» та «вологої» форм вікової макулярної дегенерації.

Об'єкт дослідження: генетичні особливості у хворих на вікову макулярну дегенерацію із різними клінічними формами.

Предмет дослідження: діагностичне та прогностичне значення однонуклеарних поліморфізмів rs1800629 гена TNF, rs1061170 гена CFH, rs11200638 гена HTRA1 у хворих на вікову макулярну дегенерацію.

Методи дослідження: загальноклінічні, офтальмологічні (візометрія по таблицям Головіна-Сивцева; рефрактометрія на автоматичному кераторефрактометрі HUVITZ, HRK-7000, AutoRef/Keratometer (Корея); біометрія, ехобіометрія на офтальмологічному ультразвуковому А-сканері-біометрі TOMЕУ AL-100 (Японія); офтальмоскопія; ОКТ на спектральному оптичному когерентному томографі SOCT Copernicus REVO (Optopol Technology S.A., Польща); молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, ПЛР-РЧ) на ампліфікаторі «iCycler IQ5» («BioRad»,

США); статистичні (метод Харді-Вайнберга, логістична регресія, побудова ROC-кривої).

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше встановлено, що серед мешканців Подільського регіону України старших 40 років виявляються комбінації генотипів генів, які можуть відповідати за експресію біомолекулярних речовин, що приймають участь в розвитку ВМД. Зокрема, високу прогностичну значущість відносно виникненням обох форм ВМД ($p < 0,001$) мали комбінації генотипів генів TNF (rs1800629), CFH (rs1061170), HTRA1 (rs11200638): G/A-T/T-G/G (ВШ = 0,15, 95% ДІ: 0,06-0,39, $p < 0,001$), G/G-T/T-G/G (ВШ = 0,18, 95% ДІ: 0,076 – 0,423, $p < 0,001$) та G/G-T/T-G/A (ВШ = 0,384, 95% ДІ: 0,174-0,846, $p = 0,015$). Причому носійство двох останніх комбінацій мало найбільший протективний вплив щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД – ВШ = 0,016 (95% ДІ: 0,005-0,053, $p = 0,007$) та ВШ = 0,053 (95% ДІ: 0,021-0,137, $p = 0,002$), відповідно.

Привертає увагу той факт, що частим фенотиповим проявом носійства мінорної алелі А гена HTRA1 (rs11200638) є те, що шанс виникнення «сухої» форми ВМД підвищується у 2,88 разів (OR=2,88; 95 % ДІ 1.84 – 4.49), а «вологої» – в 2.43 рази (OR=2,43; 95% ДІ 1.57 – 3.77) ($p < 0,001$). При цьому носійство поліморфного варіанту генотипу - GA збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 6,84 разів (OR=6,84; 95 % ДІ 3.51 – 13.34), а «вологої» – у 1.88 рази (OR=1.88; 95 % ДІ 1.08 – 3.30) ($p < 0,01$). Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) підвищує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.39 рази (OR=2.39; 95 % ДІ 0.21 – 26.82) ($p < 0,001$)., «вологої» форми ВМД у 13.30 рази (OR=13.30; 95 % ДІ 1.68– 105.10) ($p < 0,001$).

Показано, що успадкування поліморфних варіантів гена CFH (rs1061170) теж грає важливу роль у розвитку ВМД. Носійство мінорної алелі С підвищує

шанси виникнення «сухої» форми захворювання у 2,31 рази (OR=2,31; 95 % ДІ 1,5-3,55), а «вологої» – у 3,96 рази (OR=3,96; 95 % ДІ 2,59-6,04) ($p<0,001$). Носійство гетерозиготного генотипу (ТС) підвищує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 1.98 рази (OR=1.98; 95 % ДІ 1.12–3.52), а «вологої» – у 1.35 рази (OR=1.35; 95 % ДІ 0.77 – 2.37) ($p<0,001$). Водночас генотип СС збільшує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.84 рази (OR= 2.84; 95 % ДІ 1.10 – 7.31), а «вологої» – у 7.56 рази (OR=7.56; 95 % ДІ 3.16 – 18.09) ($p<0,001$).

Додатковий аналіз наслідків успадкування поліморфізму вищезгаданих генів вперше показав, що існує взаємозв'язок між розвитком ВМД та окремими варіантами генотипу гена TNF (rs1800629). Наявність мінорної алелі А підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2.39 рази (OR=2.39; 95 % ДІ 1.75 – 4.29), а «вологої» – в 2.74 рази (OR= 2.74; 95 % ДІ 1.75 – 4.29) ($p<0,001$). Носійство гетерозиготного варіанту поліморфізму (GA) підвищує ризик виникнення «сухої» форми ВМД у 2.68 рази (OR=2.68; 95 % ДІ 1.49 – 4.81), а неоваскулярної форми – у 4.05 рази (OR= 4.05; 95 % ДІ 2.25 – 7.28) ($p<0,001$). У гомозиготних носіїв мінорної алелі (AA) збільшує шанс виникнення «сухої» форми патології у 2.90 рази (OR= 2.90; 95 % ДІ 0.73 – 11.58), а «вологої» – у 2.24 рази (OR=2.24; 95 % ДІ 0.54 – 9.22) ($p<0,05$).

Водночас, вперше встановлено, що комбінації генотипів G/G-T/T-G/G, G/A-T/T-G/G та G/G-T/T-G/A відіграють протективну роль у виникненні хвороби.

Практичні результати досліджень.

Використання молекулярно-генетичного аналізу поліморфізмів rs1800629 TNF, rs1061170 CFH, rs11200638 HTRA1 у комплексі з клінічними даними та іншими алгоритмами функціональної діагностики допоможе у постановці правильного діагнозу і прогнозуванні перебігу ВМД.

Дані, які були отримані в результаті даного дослідження можуть бути використані як референтні при дослідженні схильності людей до даного захворювання.

Комплексна оцінка алельних поліморфізмів дозволить спрогнозувати перебіг та можливе прогресування ВМД з метою призначення ефективного лікування для попередження інвалідизації хворих.

За допомогою проведення генетичних скринінгів з визначенням наявності поліморфізмів у вищезгаданих генах можна сформувати групи ризику, які в подальшому будуть мати змогу дотримуватися профілактичних заходів з метою попередження розвитку ВМД.

Впровадження в практику

Отримані результати впроваджені у роботу медичного центру ТОВ «Оптимал-М» (м. Вінниця). Наукові та практичні положення дисертації були впроваджені в навчальний процес кафедри очних хвороб Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова та кафедри медичної біології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Особистий внесок здобувача

Дисертація є особистою науковою роботою здобувача. Вибір теми дисертації, напрямок дослідження, формулювання завдань, методологія побудови роботи розроблені спільно з науковим керівником к.мед.н., професором Н. В. Малачковою.

Автор самостійно провів патентно-інформаційний пошук, аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури з досліджуваної теми.

Здобувач самостійно здійснив підбір і рандомізацію хворих у групи, провів офтальмологічні та клінічні дослідження, створив базу даних. Молекулярно-генетичні дослідження виконані на базі біохімічної лабораторії та

Навчально-наукової клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова.

Статистична обробка отриманих результатів клінічних та молекулярно-генетичних досліджень, а також дисперсійний і дискримінаційний аналіз отриманих даних виконаний автором самостійно.

Обговорення та узагальнення отриманих результатів, формулювання положень наукової новизни, практичної значимості, а також висновків та практичних рекомендацій сформульовані спільно з науковим керівником к.мед.н., професором Н. В. Малачковою.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, здобувачу належала провідна роль у формулюванні мети, завдань, методології дослідження, статистичній обробці та аналізі результатів.

Апробація результатів дисертації

Основні положення й результати роботи були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «MODERN DIRECTIONS AND MOVEMENTS IN SCIENCE» (6-8 жовтня 2022р., Люксембург); науково-практичній конференції з міжнародною участю «SCIENCE AND EDUCATION IN PROGRESS» (26-28 жовтня 2022р у м. Дублін, Ірландія); XIII Міжнародній науково-практичній конференції "INTERNATIONAL SCIENTIFIC DISCUSSION: PROBLEMS, TASKS AND PROSPECTS" (16-18 жовтня 2022 року в м. Брайтон, Великобританія).

Публікації

Основні результати дисертації викладені в 7 наукових публікаціях. З них 4 роботи – статті в журналах відповідно до «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на

здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук»»; 3 роботи – тези у матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація викладена українською мовою на 141 сторінках комп'ютерного тексту і містить вступ, сім розділів, висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел та 2 додатки. Дисертація ілюстрована 45 таблицями та 16 рисунками. Список літератури містить – 157 джерела (9 кирилицею та 148 латиницею).

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ДІАГНОСТИКИ ТА ПАТОГЕНЕЗУ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ: РОЛЬ ГЕНЕТИЧНИХ ЧИННИКІВ

(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Поширеність вікової макулярної дегенерації

ВМД є другою за значимістю нозологією у світі, що призводить до порушення зору та сліпоти (8,7 %) при цьому вона залишається провідною причиною зниження зору в економічно розвинених країнах [1, 115]. В цілому тільки від 30 до 40 % пацієнтів з ВМД мають гостроту зору в 0,3 і приблизно кожен шостий пацієнт продовжує втрачати гостроту зору та прогресує до сліпоти навіть при стандартному лікуванні сильними інгібіторами VEGF [116].

Поширеність ВМД серед представників різних етнічних груп неоднакова. Дані, отримані в дослідженнях Macular Photocoagulation Study і Baltimore Eye Study, свідчать про те, що пізні стадії ВМД у представників європеїдної раси виявляються частіше, ніж у представників афроамериканської [117]. Наприклад, у осіб із синім забарвленням райдужки ризик захворіти ВМД вищий, ніж у людей із коричневою райдужкою [132]. Генез цього механізму до цих пір невідомо, проте, існує теорія, згідно з якою меланін захищає клітини ПЕС від накопичення ліпофусцину, який є маркером клітинного старіння і грає одну з провідних ролей у патогенезі захворювання [118, 119]. У своїх дослідженнях Kanski J. et al. повідомляють, що поширеність ВМД у Сполучених Штатах Америки спричиняє важку втрату зору у 54 % випадках у європеїдного населення, 14 % в латиноамериканців та 4 % у афроамериканців. Поширеність зростає з віком, тому симптоми рідше проявляються у людей молодших 50 років. У Великобританії значне порушення зору через ВМД

трапляється у 4 % пацієнтів старше 75 років, а 14 % осіб старше 90 років [121]. Проте, захворюваність ВМД низька в осіб молодше 50 років (0,05 %), але зростає до 11,8 % у осіб старше 80 років [120].

Очікується, що у зв'язку зі старінням населення в усьому світі кількість пацієнтів із ВМД зросте до 288 мільйонів у 2040 році [130]. Оскільки, на території Азії проживає більша частина населення світу, прогнозується, що кількість випадків сягне 113 мільйонів до 2040 року [130]. В свою чергу, через найвищу поширеність ВМД у Європі, припускається, що за кількістю майбутніх випадків цей регіон посяде друге місце після Азії [130].

Населення Китаю становить приблизно одну п'яту населення світу. Song P. et al. повідомили, що поширеність ВМД відрізняється в різних географічних регіонах країни. Поширеність ВМД зосереджена в найбільш густонаселених районах південно-центрального Китаю, на рівні 6,64 % (95 % ДІ = 5,12–8,52) і 6,74 % (95 % ДІ = 5,20–8,65) у 2000 і 2010 роках відповідно, та зростає зі зменшенням широти [131].

1.2 Етіологія, патогенез та фактори ризику вікової макулярної дегенерації: сучасні дані

Причини розвитку ВМД не до кінця вивчені, на сьогодні ключовим моментом у формуванні субретинальної неоваскуляризації є порушення балансу між про- і антиангіогенними факторами [133].

Основними ланками патогенезу ВМД є дегенеративні зміни в клітинах сітківки і міжклітинному матриксі, оксидативний стрес, порушення ліпідного обміну та розвиток патологічного ангиогенезу [123].

Проведені численні дослідження продемонстрували сімейний, спадковий характер процесу розвитку цього захворювання. За даними J.D. Gass, сімейний

анамнез є важливим фактором ризику у 20 % хворих ВМД. Встановлено триразове зростання ризику розвитку ВМД, якщо захворювання зустрічається у родичів в першому поколінні відносно пробанда [124].

Провідним патогенетичним механізмом розвитку захворювання вважається гіпоксія сітківки, яка веде до вироблення ангиогенних факторів (ендотеліального фактора росту судин, VEGF), що у свою чергу індукує неоваскулярну проліферацію [125].

На сьогоднішній день дослідження генетичних маркерів при розвитку ВМД і особливостей їх взаємодій має велике значення [126]. Сімейний анамнез, генетика та рання ВМД є основними чинниками, що призводять до розвитку пізньої ВМД [133, 134].

Серцево-судинні захворювання були запропоновані як фактори ризику ВМД. У своїх дослідженнях Hu C. C. et al. та Tan J. S. et al. повідомляють про підвищений ризик виникнення інсульту та розвитку серцевих нозологій, а Leeuwen R. et al. демонструють зв'язок між гіпертензією і ожирінням та ризиком розвитку ВМД [135, 136, 137]. Статева приналежність, дисліпідемія та діабет також були пов'язані з ВМД у деяких, але не у всіх дослідженнях. Так, Rudnicka A. R. et al. у своєму метааналізі доводять, що жінки мають вищий ризик неоваскулярної ВМД порівняно з чоловіками [138]. Згідно з метааналізом Connell P. P et al., певну роль у епідеміології ВМД можуть відігравати жіночі гормони [140]. Також у деяких дослідженнях фізична активність продемонструвала профілактичний ефект, що дає можливість визначати її як впливовий фактор на розвиток ВМД [139].

Останнім часом з'являється все більше доказів того, що генетична сприйнятливість, відіграє значну роль у розвитку ВМД [140]. Seddon J. M. et al. у своїх дослідженнях оцінили генетичний вплив на ВМД і виявили, що роль

спадковості коливаються в межах 46-71 %. Тому, існує значна можливість змінити поширеність ВМД через ідентифікацію та управління модифікованими факторами ризику, в даному випадку генетичним матеріалом [141].

1.3 Генетичні аспекти розвитку вікової макулярної дегенерації

Сучасні дані свідчать, що на розвиток дисбалансу у системі ангиогенезу впливає ряд генетичних факторів, які беруть участь у регуляції імунної відповіді та розвитку місцевого запалення у сітківці. Це є передумовою створення клітинного та молекулярного середовищ, сприятливого для поширення проангіогенних чинників або навпаки, розвитку атрофії певних ділянок макули [121, 122].

Значний вплив на патогенез ВМД мали генетичні фактори, загалом, було повідомлено про 103 гени або локуси, пов'язані з ВМД [142]. CFH і HTRA1 є двома основними генетичними предикторами, що асоціюються із розвитком ВМД. У 2005 році дослідники вперше пов'язали алель 402H CFH з підвищеним ризиком ВМД [143]. CFH є ключовим регулятором шляху комплементу, розташований 1q32. CFH 402H не дозволяє транспортувати окислювальні ліпіди із зовнішнього ядерного шару сітківки, порушує регуляторну функцію CFH у інгібуванні активації C3 до C3b і деградації C3b, що призводить до надмірної активації комплементу, таким чином збільшуючи ризик ВМД [142, 143, 144]. CFB та C2 є активаторами альтернативного та класичного шляху. Гаплотип CFB R32Q і R32Q/IVS10 є резистентними для розвитку ВМД [145]. Поліморфізм R102G (rs2230199) C3 також бере участь у перебігу ВМД від ранньої її форми до пізньої. Білковий комплекс комплементу: C3a та C3 наявний у неактивному стані у мембрані склоподібного тіла [146]. C3a під впливом різних факторів може індукувати експресію VEGF і сприяти хронічній неоваскуляризації. Одним із основних факторів комплементу є CFI, який регулюється CFH і є кофактором інактивації C3b [147]. Дослідження Yang Z. et

al. показало, що поліморфізми: rs10033900, rs11728699, rs6854876, rs7439493 і rs13117504 мають захисну дію, бо не впливають значним чином на фактори комплементу, в той час як поліморфізм rs2285714 асоціювався з підвищеним ризиком ВМД. Ген HTRA1 є ще одним основним локусом, який відіграє значну роль у патогенезі ВМД [148]. Генний поліморфізм rs10490924 у промоторній області HTRA1 може збільшити ризик ВМД у 15 разів [149].

У своїх роботах Liu J. et al. і Hoh J. et al., виявили, що дисрегуляція у роботі CFH призводить до підвищеної міграції ендотеліальних клітин, тим самим сприяючи ангиогенезу у зоні запалення, що може служити за механізм трансформації «сухої» форми ВМД у «вологу» і потребує подальших досліджень [21]. Окрім того, Khanani A. et al. виявили, що міграція імунокомпетентних клітин у зону запалення супроводжується підвищенням концентрації ангиопоетину і VEGF, які рахуються одними з основних факторів ангиогенезу, чим також можна пояснити процеси неоваскуляризації в сітківці при наявності мутантної алелі С гена CFH у пацієнта [22].

Ген CFH (також відомий як AC3bINA, адrenomедулін-зв'язуючий білок-1, фактор Н АМ-зв'язуючого білку-1, β 1H-глобулін, прискорювач інактиватора С3b, Н-фактор або Н-фактор-1) є важливим членом регуляторів системи комплементу [23]. CFH належить до надродини структурно та функціонально споріднених білків, які називаються регуляторами активації комплементу Н (Regulators of Complement Activation), що кодуються кластером генів у хромосомі 1q31 та містить 23 екзони і охоплює більше ніж 94 кб геномної ДНК [24-27]. Його кодуюча ділянка знаходиться у локусі 1q31.3, на довгому плечі хромосоми 1 – експресований протеїн складається з 1231 амінокислот, що об'єднані у 20 повторюваних патернів (коротких консенсусних повторів – short consensus repeats, SCRs) по 60 амінокислот, та має молекулярну масу 139096 Да. [26-30]. Цей ген був першим із зареєстрованих варіабельних ділянок у цьому

кластері [31, 32]. CFH зазвичай виступає як базовий репресор вродженої імунної системи, що гальмує шлях переходу C3 у C3b в каскаді перетворень системи комплементу [33, 34]. Системний дефіцит CFH сприяє надмірній та патогенній активації альтернативного шляху комплементу, пов'язаного з підвищеною його активністю стосовно здорових клітин господаря, автоімунними реакціями, вторинною альтерацією тканин та стійкою або хронічною запальною відповіддю на неспецифічні подразники [35]. Протизапальний ефект CFH у великій мірі залежить від статусу пов'язаного з геном-експресором поліморфізму rs1061170, також відомого в міжнародній номенклатурі як Tyr402His, Y402H або 1277 T→C, і розташованого у функціональному домені гена [31, 36, 37]. Ділянка білку, що знаходиться під впливом цього поліморфізму, являє собою короткий консенсусний повтор 7 (SCR7) і призводить до неправильного функціонування білка CFH, виступає пріоритетним місцем зв'язування з гепарином, глікозаміногліканами, M-білком стрептококу та C-реактивним білком [10, 11, 29, 36], тому генетичні варіації у даному сайті зв'язування демонструють знижену здатність приєднувати останній і, таким чином, унеможливають достатнє гальмування ефекторних ланок комплементу [38, 39].

Відомо, що компоненти каскаду комплементу ідентифікуються у пацієнтів, хворих на ВМД: так відкладення знаходять у мембрані Бруха, міжкапілярних стовпах та в друзах [40-42]. Це призвело до формулювання гіпотези, що ВМД є результатом аберантного запального процесу внаслідок невідповідної активації комплементу, проте, результати клінічних досліджень виявились суперечливими [41]. Наприклад, Fukuda Y. et al. у своїй роботі серед 327 пацієнтів виявили підвищену схильність до утворення парадруз та розвитку ВМД в осіб з мутантною алеллю гена CFH, тоді як у друзах спостерігалась висока концентрація білків системи комплементу та самого CFH [43]. Klein R.

et al. навпаки, виявили протективний вплив мутантної алелі на виникнення пізньої ВМД [41].

Пізніше вчені прийшли до висновку, що сила зв'язку між поліморфізмом rs1061170 і ВМД знижується у дослідженнях із Заходу на Схід. Наприклад, Maugeri A. et al. виявили, що у європейській популяції ризик захворювання збільшився у 2,04 рази при наявності поліморфізму, тоді як більшість індивідуальних досліджень, що були проведені в азійській популяції повідомляли про відсутність асоціації з жителями Кореї, Японії та Китаю, що певною мірою пояснюється низькою частотою мінорних алелей в азійській популяції [150].

Альтернативною точкою прикладання у патогенезі ВМД виявився продукт гена HTRA1, який було вперше ідентифіковано у фібробластах людини як чутливий до трансформації білок, а назву присвоєно внаслідок надзвичайної схожості з сімейством HtrA серинової протеази *Escherichia coli*, яка має важливе значення для існування бактерій в умовах високих температур [44, 45]. Ефекти HTRA1 цим не обмежуються – він виступає універсальним тригером реакції на стрес, в тому числі окислювальний; на інфекційні агенти, підвищену фагову активність та синтез аберантних білків всередині бактеріальної клітини [46]. За даними Suranji S. et al., дисрегуляція оксидантної та антиоксидантної систем, що також виникає при поліморфізмі rs11200638, сприяє прискореному старінню клітин RPE через шлях p38, тим самим викликаючи атрофічні та дегенеративні зміни у ділянці макули, що слугує початком для виникнення «сухої» форми ВМД [47]. При цьому, завдяки своєму впливу на імунокомпетентні клітини, які здатні продукувати проангіогенні фактори, включаючи VEGF, вважається, що HTRA1 також залучений до прогресування захворювання із виникненням «волоγοї» форми ВМД [48, 49].

HTRA1 (ген, що кодує HtrA серинову пептидазу 1) розташований на

довгому плечі 10-ї хромосоми, у локусі 10q26.13 і містить 9 кодуєчих ділянок [24, 37, 51-53]. Продукт мРНК, синтезований на матриці гена HTRA1, має довжину 2138 азотистих основ та відкриту рамку зчитування довжиною 1443 пар нуклеотидів. Кінцевим продуктом гена є поліпептид молекулярною масою 50 кДа, що формується із 480 амінокислотних залишків і є представником серинових протеаз сімейства трипсину [53].

Поліморфізм rs11200638 -625 G>A у промоторній ділянці гена HTRA1 довжиною 512 пар основ, розташований приблизно на 7 кб нижче LOC387715/ARMS2 [37, 50, 52, 62]. Дана мутація по типу вставки/делеції, локалізованої між bp -3,836 та -3,783, у ряді досліджень демонструвала активність регулятора транскрипції цільового гена, унікальну для послідовності вставки/делеції в цілому [58, 63].

Стосовно алельних варіацій вірогідно відомо, що алель ризику А для rs11200638 асоціюється з підвищеним рівнем експресії його мРНК та білка, що, своєю чергою, підсилює біологічні ефекти протеїну, зокрема: гомозигота за алелем ризику А міцно асоційована з підвищенням ризику ВМД в середньому у 10 разів; гетерозигота зберігає патогенну здатність у 2 рази більше, ніж гомозигота за алелем G [53, 65, 66, 67]. Тобто генотип AA значно підсилює транскрипційні впливи гена HTRA1 у порівнянні з генотипом GG [56].

Повногеномні дослідження виділяють близько 30 потенційних локусів, що здатні впливати на перебіг ВМД тим чи іншим чином, та, враховуючи дані з різних популяцій, стабільно міцний зв'язок поліморфізму із дегенерацією макули проявляв саме rs11200638, незалежно від географії досліджень. Пул включав: чеську, китайську, східну кавказьку, французьку, італійську, фінську, індійську етнічну групи, при цьому вищевказані закономірності зберігалися у переважної більшості досліджуваних [44, 48, 50, 63, 68]. Ця інформація знаходить і патоморфологічне підтвердження – значна експресія білка HtrA

спостерігалася у друзах, що є одним з головних проявів патології, а також пігментному епітелії сітківки та неоваскулярних утворень хоріоїдеї в осіб із ВМД [14].

Цитокиновий фактор некрозу пухлини альфа (tumor necrosis factor α , TNF- α) – один із головних регуляторів імунної системи, що здатен впливати на апоптоз, проліферацію та диференціацію клітин, локальне й системне запалення, імунну відповідь через його сайт зв'язування – TNF-рецептор 1 типу (TNFR1) [82]. Відомо, що TNFR1 може викликати окислювальний стрес безпосередньо шляхом активації ферментів, що продукують активні форми кисню та активні форми азоту, залучаючи фундаментальні сигнальні шляхи NFE2L2, PGC-1, p62, AMPK й PI3K / Akt / mTOR [70]. Його поліморфізм rs1800629 викликає заміну гуаніну (G) на аденін (A), що призводить до збільшення транскрипційної активності TNF- α у 2-3 рази [71, 72].

Участь TNF- α в запаленні і його генетичний вплив на інші цитокини грає важливу роль в прогресуванні та ускладнення захворювання [127]. Передбачається, що запалення відіграє важливу роль у патогенезі цієї складної і багатофакторної нозології [128]. Транскрипція TNF- α генетично регулюється, і нещодавні дослідження показали, що поліморфізм промоторів в положеннях -238 (rs361525), -308 (rs1800629) і -863 (rs1800630) однойменного гена можуть регулювати продукцію протеїна TNF- α [129].

Первинні ефекти TNF пов'язані з цитоплазматичним доменом TNFR1, що послідовно активує домени смерті, які афінно зв'язуються з рецептором TNF- α , такі як TRADD (tumor necrosis factor receptor type 1-associated via death domain protein), Fas (Fas associated death domain, FADD) та каспаза-8 (також відому як FADD-подібний до ICE, Fas-associated death domain-like IL-1 β -converting enzyme, або FLICE), тим самим сприяючи дегенерації численних білків у сітківці [73].

Разом з тим, внаслідок взаємодії з антиапоптичним рецептором DCR1 (decoy receptor 1, також відомий як TRAIL receptor 3 (TRAILR3)) TNF- α реалізує свій вплив на сигнальні шляхи регуляції апоптозу та неоваскуляризації, проліферації та диференціації, імунного розпізнавання та запальної відповіді. Наприклад, зв'язуючись з антиапоптотичним рецептором DCR1, TNF- α попереджує дегенерацію клітин у сітківці, проте, через зниження чутливості самого рецептора у пацієнтів з обома формами ВМД, що також може бути опосередковано TNF- α , апоптичні процеси в макулі розвиваються у надмірних масштабах, викликаючи «атрофічну» форму ВМД [74].

Ще одним вірогідним патофізіологічним механізмом виникнення ВМД при поліморфізмі rs1800629 гена TNF є регуляція оксидативного стресу в організмі. Вважається, що TNF- α залучений у регуляції сімейства антиоксидантних систем, які захищають клітину від оксидативного стресу, запускаючи не тільки низхідні впливи, але й отримуючи зворотний зв'язок щодо власної експресії [77]. Так, він активно взаємодіє через клітинні та молекулярні маркери запалення та окисного стресу (наприклад, IL-1 β , TGF- β , ABCG1, ABCA1, відновлений глутатіон), і майже кожен з них змінює метаболізм активних форм кисню у клітинах пігментного епітелію сітківки, обмежуючи оксидативний стрес за фізіологічного функціонування. Додатковим доказом асоціації між TNF та активними формами кисню є здатність інгібіторів каспаз та жиророзчинних акцепторів вільних радикалів (наприклад, токоферолу) послаблювати цитотоксичність, індуковану ВМД, зокрема при лікуванні блокаторами TNF [78].

Разом з тим, можливість рецептора R1, який взаємодіє з TNF- α , викликати окислювальний стрес безпосередньо шляхом активації продукції активних форм кисню та азоту, які володіють потужними прозапальними та проапоптичними ефектами, а також виявлена Kim Y. et al. їх роль у розвитку

неоваскуляризації, що підтверджує вищенаведені відомості про шляхи впливу rs1800629 гена TNF на виникнення ВМД, які дозволяють додатково підтвердити його можливий зв'язок із цим захворюванням [79].

Подальші дослідження, які направлені на вивчення генетичних факторів, що призводять до розвитку вікової макулярної дегенерації сприятиме виділенню групи ризику даної нозології. Це дозволить вищезгаданим особам дотримуватися превентивних заходів, що грають велику роль у попередженні прогресування даної хвороби та інвалідизації хворих.

Розділ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Дизайн дослідження і клінічна характеристика хворих

Дослідження було просте когортне типу «випадок- контроль» та носило проспективний характер. Дослідження розпочинали після отримання згоди пацієнта. Клінічні дослідження за хворими на вікову макулярну дегенерацію виконували в період з 2019 по 2021 роки на базі ТОВ «ОПТИМАЛ-М» (м. Вінниця).

Досліджували 291 пацієнта, серед яких 186 пацієнта з різними формами ВМД– основна група, та 105 пацієнтів без ВМД – група порівняння.

Серед обстежених було 121 чоловіків (42 %) і 170 жінок (58 %). Вік пацієнтів - від 40 до 89 років.

У дослідженні застосували такі критерії відбору:

Критерії включення пацієнтів у дослідження:

- вік пацієнта 40 років та більше;
- наявність підтвердженої вікової макулярної дегенерації (основна група) або її відсутність (група порівняння);
- інформована письмова згода пацієнта (представника пацієнта) на участь в дослідженні;
- здатність пацієнта до адекватної співпраці в процесі дослідження.

Критерії невключення:

- вік пацієнтів менше 40 років;
- неможливість проведення офтальмоскопії та ОКТ;

- наявність глаукоми або інших офтальмологічних захворювань, що можуть знижувати гостроту зору;
- системні захворювання (цукровий діабет, ревматизм тощо);
- наявність психічних захворювань та розладів, що заважатимуть пацієнтові розумінню умов участі в дослідженні.

Критерії виключення пацієнтів із дослідження:

- відмова пацієнтів проходити певні етапи діагностичних досліджень або недотримання строків проходження досліджень.

Всіх пацієнтів, які проходили обстеження в рамках даної дисертаційної роботи, було розділено на групи:

Група I – 105 пацієнтів без вікової макулярної дегенерації на обох очах (група порівняння).

Група II – 89 пацієнта з віковою макулярною дегенерацією, сухою формою, на одному чи на обох очах («суха» форма).

Група III – 97 пацієнтів з віковою макулярною дегенерацією: трансудативним відшаруванням пігментного епітелію сітківки, ексудативною формою, субретинальним фіброзом на одному чи на обох очах («волога» форма).

2.2. Класифікація вікової макулярної дегенерації

У практичній офтальмології застосовують терміни «суха» (неексудативна, атрофічна) форма і «волога» (ексудативна, неоваскулярна) форма ВМД[98]. «Суха» форма характеризується в першу чергу повільно прогресуючою атрофією ПЕС в макулярній зоні і розташованої під ним хоріоїдеї, що призводить до локальної вторинної атрофії фоторецепторного шару сітківки. Іншими словами, неексудативна форма характеризується друзями в

макулярній зоні сітківки, дефектами ПЕС, перерозподілом пігменту, атрофією ПЕС і хоріокапілярного шару[98]. «Волога» форма» проростання беруть початок у внутрішніх шарах хоріоїдеї новоутворених судин через мембрану Бруха у відсутній в нормі простір між ПЭС та сітківкою. Ангіогенез супроводжується ексудацією в субретинальний простір, набряком сітківки та крововиливами. Таким чином, ексудативна форма характеризується наступними стадіями: ексудативне вілшарування ПЭС, ексудативне відшарування нейроепітелію сітківки, неоваскуляризація (под ПЭС та під нейроепітелієм сітківки), ексудативно-геморагічне вілшарування ПЭС та/або нейроепітелію сітківки, стадія рубцювання [98].

Американська академія офтальмології рекомендує класифікацію, розроблену в процесі дослідження вікової очної патології (Age-Related Eye Disease Study –AREDS) та пропонує використовувати її для оцінки важкості та прогнозу ВМД [16, 114]:

1. Відсутність ВМД (категорія 1 AREDS) – контрольна група в дослідженні AREDS, відсутність або невелика кількість дрібних друз (діаметр < 63 мікрон).

2. Рання стадія ВМД (категорія 2 AREDS) – множинні дрібні друз, невелика кількість друз середнього розміру (діаметр від 63 до 124 мікрон) або початкові зміни пігментного епітелію сітківки.

3. Проміжна стадія ВМД (категорія 3 AREDS) – множинні друз середнього розміру, принаймні, одна велика друза (діаметр \geq 125 мікрон) або географічна атрофія, що не зачіпає центральної ямки.

4. Пізня стадія ВМД (категорія 4 AREDS) – характеризується однією або кількома з наступних ознак (при відсутності інших причин) на одному оці:

1) географічна атрофія ПЕС та хоріокапілярного шару в ділянці центральної

ямки сітківки;

2) неоваскулярна макулопатія:

- хоріоїдальна неоваскуляризація;
- серозне та/або геморагічне відшарування ПЕС;
- тверді ексудати;
- субретинальна фіброваскулярна проліферація та фіброваскулярна проліферація під ПЕС;
- дисковидний рубець.

2.3. Офтальмологічні дослідження

Офтальмологічне обстеження проводили на базі ТОВ “ОПТИМАЛ–М” (м. Вінниця).

Дослідження гостроти зору та суб'єктивної рефракції.

Візометрію при попередньому відборі пацієнтів проводили за допомогою таблиць Головіна-Сівцева. Таблиця складається з двох частин по 12 рядків у кожній, які представляють значення гостроти зору від 0,1 до 2,0. Ліва частина складається з рядів кирилических літер Ш, Б, М, Н, К, Ї та И у певному порядку, а права частина таблиці складається з ряду символів Ландольта С. Ширина кожного символу дорівнює його висоті, а контури мають стандартні проміжки в $1/5$ від загального розміру. Значення D, зазначене зліва від кожного рядка, дає відстань у метрах, з якої людина з гостротою зору 1,0 може прочитати відповідний рядок. Значення V, вказане праворуч, дає мінімальну гостроту зору, необхідну для читання рядка з відстані 5 метрів. Перший ряд містить символи розміром 70 мм ($V = 0,1$); другий ряд 35 мм; нижній третій ряд 7 мм ($V = 1,0$); нижній ряд 3,5 мм ($V = 2,0$) [97] (рис.2.1).

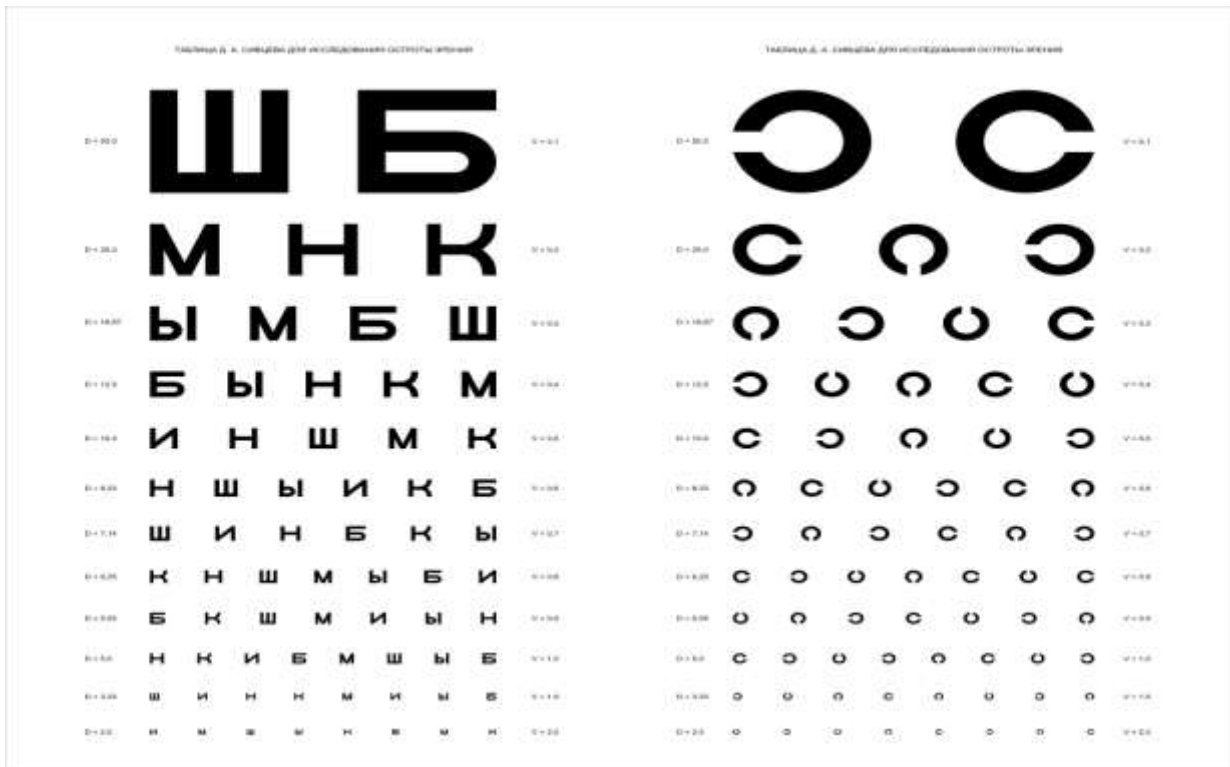


Рис. 2.1 – Таблица Головіна-Сівцева для визначення гостроти зору.

Дослідження суб'єктивної рефракції проводили за допомогою набору офтальмологічних пробних очкових лінз “Біомед” комплект з 266 лінз) виробництва Jiangsu Yuuyue Medical Equipment & Supply Co., Ltd (КНР).

Рефрактометрія.

Визначення об'єктивної рефракції проводили за допомогою автоматичного (Корея).

Периметрія.

Визначення полів зору виконували за допомогою проекційного периметра PTS 1000 "Optopol technology" (Польща). Відповідно до стандартів Всесвітньої

глаукомної асоціації (2002) статична периметрія є найбільш інформативним методом обстеження в порівнянні з кінетичною периметрією.

Офтальмоскопія.

Огляд очного дна виконували за допомогою тієї ж щілинної лампи (Topcon) та асферичної безконтактної лінзи 90 дптр. (OCULAR MaxField®) в умовах медикаментозного мідріазу за загальноприйнятою методикою. А за необхідності контактним методом за допомогою трьохдзеркальної лінзи Гольдмана та щілинної лампи SL-1E “Topcon” (Японія).

Гоніоскопія

Огляд кута передньої камери ока, за допомогою трьохдзеркальної лінзи Гольдмана, виконували в разі наявності підозри його патологічної зміни, наприклад неоваскуляризації.

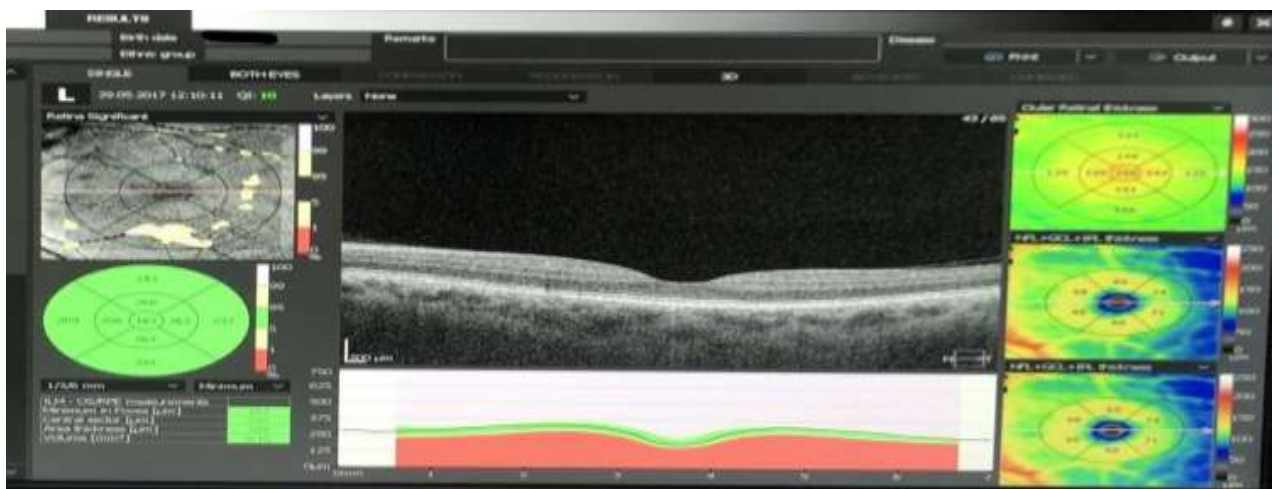
Оптична когерентна томографія.

Оптичну когерентну томографію виконували для визначення профілю сітківки при віковій макулярній дегенерації , а також для визначення показників макулярної ділянки сітківки. Нами було використано параметр - ILM-RPE (internal limiting membrane-retinal pigmented epithelium; внутрішня погранична мембрана-пігментний епітелій сітківки). за допомогою спектрального оптичного когерентного топографа SOCT Corneicus “Optopol” з можливістю ангиографії (Польща).

Використання ОКТ дозволяло у кожного пацієнта проводити аналіз визначення наявності або відсутності змін морфологічної структури макули, що характерні для різних форм ВМД. При сухій формі ВМД було виявлено множинні дрібні друзи, друзи середнього розміру (діаметр від 63 до 124 мікрон), великі друзи (діаметр більше 125 мікрон), географічна атрофія,

початкові зміни пігментного епітелію. У пацієнтів з вологою формою ВМД за допомогою ОКТ візуалізували та розрізняли кістозний набряк нейроепітелію, трансудативне відшарування пігментного епітелію, класичну СНМ, хоріоретинальну судинну проліферацію, субретинальний фіброз. Процедура не потребувала додаткової підготовки пацієнта. Після вводу даних про пацієнта (номер карти, прізвище, ім'я, дата народження пацієнта) пацієнт фіксував погляд на об'єкті в лінзі фундус-камери. Камеру наближали до досліджуваного ока до того моменту, поки зображення сітківки не відображалось на моніторі. Після цього фіксували камеру натисканням кнопки фіксатора та відрегульовували чіткість зображення. Після обробки даних проводили вимірювання досліджуваних тканин та аналіз їх оптичної щільності.

Завдяки використанню ОКТ об'ємне тривимірне графічне зображення сітківки здобувалося неінвазивним способом, без необхідності проведення попередньої підготовки пацієнта, а цінність кількісного опису та оцінки топографії різних ділянок сітківки була необхідна і важлива для динамічного спостереження змін при патологічних процесах.(див. рис. 2.2).



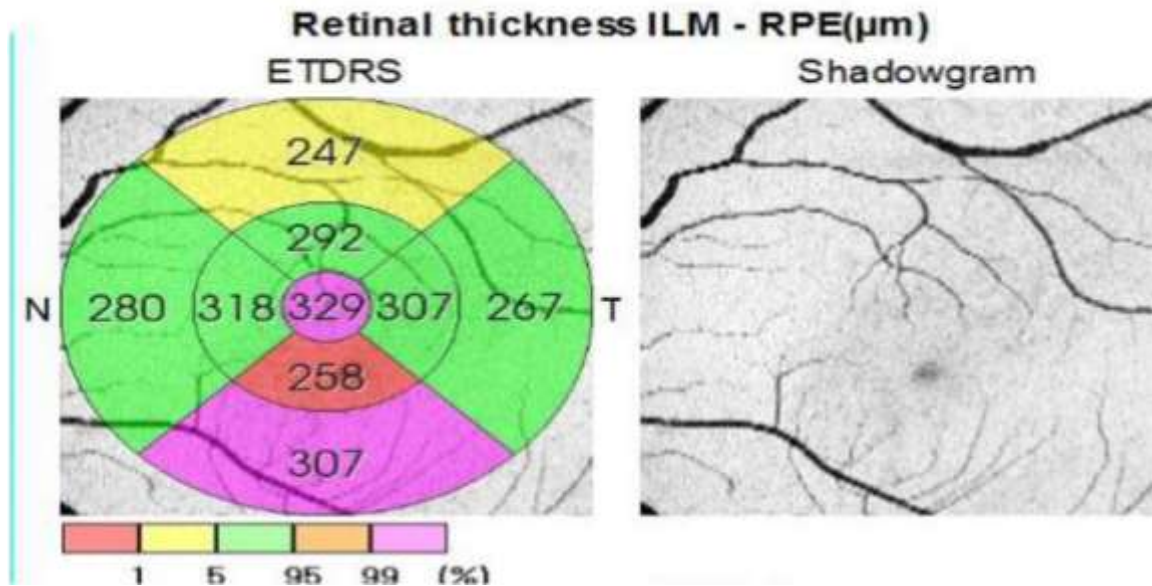


Рис. 2.2 – Оптична когерентна томографія для визначення профілю сітківки.

Фундускопія.

Флюорисцентну ангіографію і фотографування очного дна виконували за допомогою комбінованої фундус-камери TRC-NW8F «Торсон» (Японія) з можливістю проведення флюорисцентної ангіографії. За необхідності для уточнення діагнозу виконували стереоскопічне фотографування очного дна.

2.4. Методи молекулярно-генетичних досліджень

Процедуру виділення ДНК здійснювали за стандартним протоколом. Екстракцію проводили з біологічного матеріалу, який отримували методом букального зішкрібу, за допомогою набору Chelex 100 Bio-Rad (USA). Забір матеріалу виконували з дотриманням норм медичної асептики та антисептики. Взяття біологічного матеріалу здійснював кваліфікований середній медичний персонал. Для визначення поліморфізму застосували методи полімеразно

ланцюгової реакції у режимі реального часу (ПЛР РЧ) за допомогою «Системи детекції продуктів ПЛР РЧ CFX96 Touch» (BioRad, USA) та гель-електрофорез. Програмне забезпечення CFX Manager Software застосовували для детекції алелей.

У ході дослідження наступні однонуклеотидні поліморфізми (ОНП, SNP) були включені до роботи: rs11200638 гена HTRA1, rs1061170 гена CFH, rs1800629 гена TNF.

Ген **HTRA1** (HtrA Serine Peptidase 1, HtrA серинова пептидаза 1) локалізований на довгому плечі 10-ї хромосоми, у локусі 10q26.13, і містить 9 кодуєчих ділянок [83, 90]. Продуктом гена є поліпептид молекулярною масою 50 кДа, який утворений із 480 амінокислотних залишків [100]. ОНП rs11200638 знаходиться у промоторній ділянці гена HTRA1 (-625 G>A) та має довжину 512 пар основ [99, 84]. Для даного поліморфізму алель дикого типу представлена алеллю G, алель мутантного типу – А. Відповідно виділяють такі варіанти генотипів: GG – гомозигота за мажорною алеллю, GA – гетерозигота, AA – гомозигота за мінорною алеллю.

На термоциклері Bio-Rad CFX96 (BioRad, США) з використанням набору реагентів «Литех» (РФ) визначали поліморфізм методом гель-електрофорез. Протокол режиму ампліфікації був наступним: 94 °C – пауза; 93 °C – 1 хв.; 35 циклів: 93 °C – 10 с.; 64 °C – 10 с.; 72 °C – 20 с.; 72 °C – 1 хв. Після чого продукт ампліфікації розділяли у 3 % агарозному гелі, створеному на основі TAE буфера, методом горизонтального електрофорезу. Для отримання візуалізації результатів електрофорезу застосовували барвник у якості 1 % розчину бромистого етидію з розрахунку 5 мкл на 50 мл розплавленого гелю. Сяючі смужки під УФ-опроміненням із довжиною хвилі 310 нм являли собою фрагменти аналізуючої ДНК.

Задля визначення відповідного генотипу застосували алгоритм: при наявності однієї сяючої смужки, яку попередньо визначали як ймовірну мажорну алель, встановлювали генотип дикого типу, а у разі мінорної – мутантного типу; якщо наявні обидві сяючі смужки, то такий генотип відповідав гетерозиготному варіанту (див. рис. 2.3).

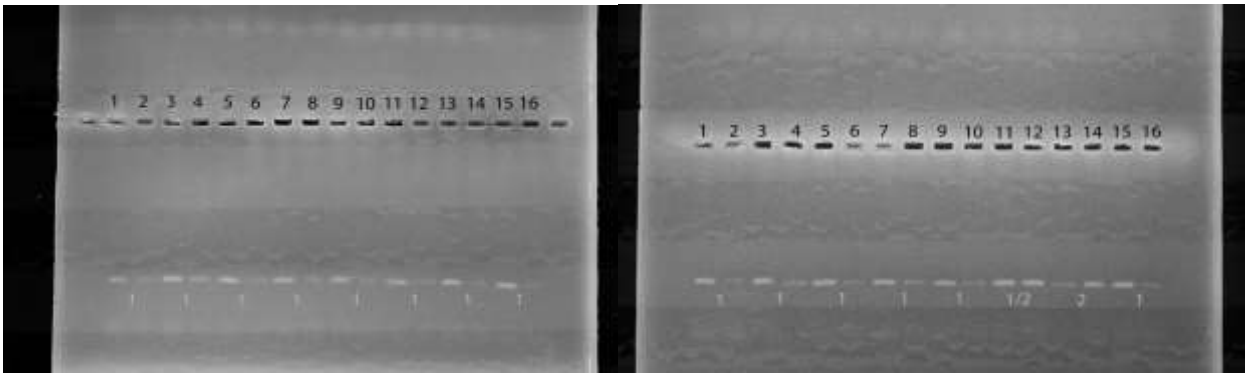


Рис. 2.3 – Визначення генотипу поліморфізму rs11200638 гена HTRA1 методом гель-електрофорезу.

Ген **CFH** (Complement Factor H, фактор комплементу H) належить до надродини споріднених білків, які називаються регуляторами активації комплементу H та кодується кластером генів у хромосомі 1q31 [83, 87]. Кодуюча ділянка CFH розташована на довгому плечі хромосоми 1, у локусі 1q31.3 [85]. Продукт гена складається з 1231 амінокислот та має молекулярну масу 139096 Да [86]. ОНП rs1061170 представлений у вигляді місенс-мутації шляхом релокації T на C у положенні нуклеотиду 1277 в 9 екзоні гена CFH, що призводить до заміни тирозину (Y) на гістидин (H) у кодоні 402 білку та носить назву Y402H [88, 89, 91]. При цьому поліморфізмі алель T являється алеллю дикого типу, алель C – мутантного. Внаслідок такого розподілу варіанти генотипів становлять: TT – гомозигота за мажорною алеллю, TC – гетерозигота, CC – гомозигота за мінорною алеллю.

Для детекції поліморфізму використовували метод гель-електрофорез на термоциклері Bio-Rad CFX96 (BioRad, США) із застосуванням набору реагентів «Литех» (РФ). Протокол режиму ампліфікації: 94 °С – пауза; 93 °С – 1 хв.; 35 циклів: 93 °С – 10 с; 64 °С – 10 с; 72 °С – 20 с; 72 °С – 1 хв. Потім виконували розділення продукту ампліфікації у 3 % агарозному гелі на основі ТАЕ буфера за допомогою горизонтального електрофорезу. З метою визначення результатів електрофорезу застосовували барвник у вигляді 1 % розчину бромистого етидію з розрахунку 5 мкл на 50 мл розплавленого гелю. Фрагменти аналізуючої ДНК представляли собою сяючі смужки під УФ-опроміненням із довжиною хвилі 310 нм.

Задля визначення відповідного генотипу використовували такий же алгоритм, як і при застосуванні методу гель-електрофорез для гена HTRA1 (див. рис. 2.3).

Ген TNF- α (tumor necrosis factor α , фактор некрозу пухлин α) знаходиться на короткому плечі 6 хромосоми, у локусі 6p21.33, містить 4 екзони, 3 інтрони та має довжину 2772 азотисті основи [92, 93]. Він кодує мультифункціональний прозапальний цитокін масою 26 кДа, у структурі якого міститься 233 амінокислоти [14]. ОНП rs1800629 локалізований у промоторній області гена TNF перед ініціатором транскрипції на 308 нуклеотиді, також відомий як G-308A внаслідок заміни гуаніну (G) на аденін (A) [94, 95]. Алеллю дикого типу являється G, у той час як A – алель мутантного типу. Варіанти генотипів становлять: GG – гомозигота за мажорною алеллю, GA – гетерозигота, AA – гомозигота за мінорною алеллю.

З метою визначення поліморфізму застосовували ПЛР РЧ з використанням набору реагентів «Литех» (РФ). Для цього застосували протокол режиму ампліфікації: 93 °С – 1 хв.; 35 циклів: 93 °С – 10 с; 64 °С – 10 с; 72 °С – 20 с – зчитування.

Можливі алельні варіанти були попередньо закодовані для подальшого встановлення генотипу наступним чином: 1 – алель дикого типу, 2 – алель мутантного типу. У разі виходу будь-якої єдиної алелі до 35 циклу генотип визначали як гомозиготу відповідного закодованого варіанті, а при виході обох алелей до 35 циклу генотип виділяли як гетерозиготу (див. рис. 2.4).

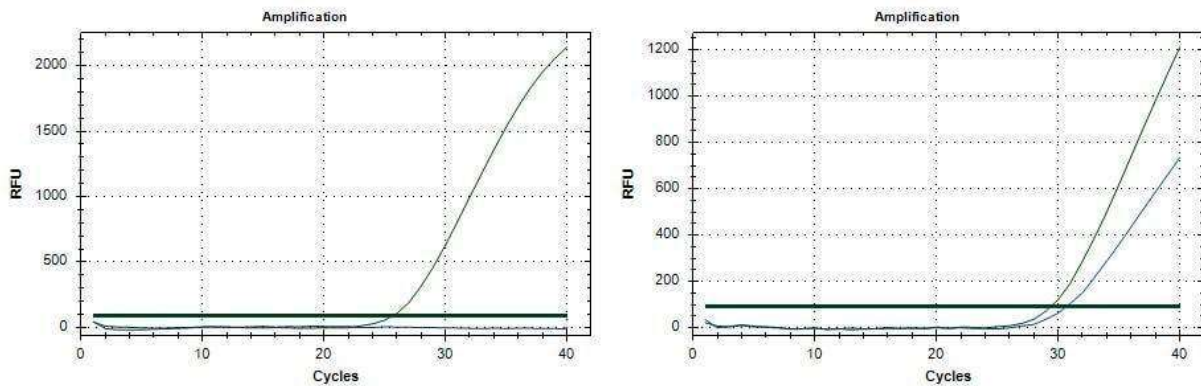


Рис. 2.4 – Визначення генотипу поліморфізму rs1800629 гена TNF методом ПЛР РЧ.

Методи статистичних досліджень

Статистичний аналіз отриманих у ході роботи результатів проводили з використанням пакетів програм Statistica 10 (StatSoft, Inc., USA) та IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

Розподіл частот генотипів перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . Методом бінарної логістичної регресії оцінювали наявність асоціації в алельній, адитивній, доміантній та рецесивній моделях успадкування. Силу асоціації аналізованих ознак визначали шляхом розрахунку величини відношення шансів (ВШ) з довірчим інтервалом (ДІ) при 95%-му рівні значущості. Передбачуваний фактор ризику вважався

значущим для розвитку патології при значенні показника ВШ з поправкою на ДІ більше одиниці. У разі статистично значущих відмінностей в будь якій з моделей успадкування застосували метод аналізу кривих операційних характеристик (ROC – Receiver Operating Characteristic curve analysis). Для цього розраховувалась площа під ROC-кривою (AUC – Area under the ROC curve), показники специфічності та чутливості. Модель вважали адекватною при статистично значущій відмінності величини AUC від 0,5. Статистично значущими вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

**ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ rs11200638 ГЕНА
HTRA1 З РОЗВИТКОМ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ****3.1 Розподіл генотипів та частота алелей поліморфних варіантів
rs11200638 гена HTRA1 у пацієнтів з ВМД та в групі порівняння.**

З метою дослідження асоціації поліморфних варіантів *rs11200638* гена *HTRA1* з розвитком вікової макулярної дегенерації в популяції Поділля було проаналізовано розподіл генотипів та алелей за цим поліморфізмом у пацієнтів без ВМД (група порівняння) – 105 осіб, у пацієнтів загальної групи хворих на ВМД (група II) – 186 осіб, а також у пацієнтів з різними формами патології – у хворх на «суху» (група III) – 89 осіб, і «вологу» (група IV) – 97 осіб, форми ВМД.

Результати генотипування в досліджених групах та відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга представлені в таблиці 3.1. Частота зустрічальності генотипів групі порівняння становила: GG – 59,05%, GA – 40,0 % AA – 0,95%; частота мінорного алеля (A) – 0,21. Частота зустрічальності генотипів в загальній групі хворх на ВМД: GG – 24,73%, GA – 68,28%, AA – 6,99%; частота мінорного алеля (A) – 0,41. Частота зустрічальності генотипів в групі пацієнтів с «сухою» формою ВМД: GG – 15,73%, GA – 82,02%, AA – 2,25%; частота мінорного алеля (A) – 0,43. Частота зустрічальності генотипів в групі пацієнтів з «вологою» формою ВМД: GG – 32,99 %, GA – 55,67%, AA – 11,34 %; частота мінорного алеля (A) – 0,39 (див. рис. 3.1).

Таблиця 3.1 - Розподіл генотипів за поліморфізмом *rs11200638* гена *HTRAI1* та його відповідність закону Харді-Вайнберга у хворих на ВМД та в групі порівняння

Група дослідження	Генотипи			Відповідність рівновазі Харді-Вайнберга	
	GG	GA	AA	χ^2	p
I (група порівняння)	62	42	1	3.42	0.06
II (всі хворі на ВМД)	46	127	13	16.62	< 0.0001
III (суха форма ВМД)	14	73	2	24.26	< 0.0001
IV (волога форма ВМД)	32	54	11	1.49	0.22

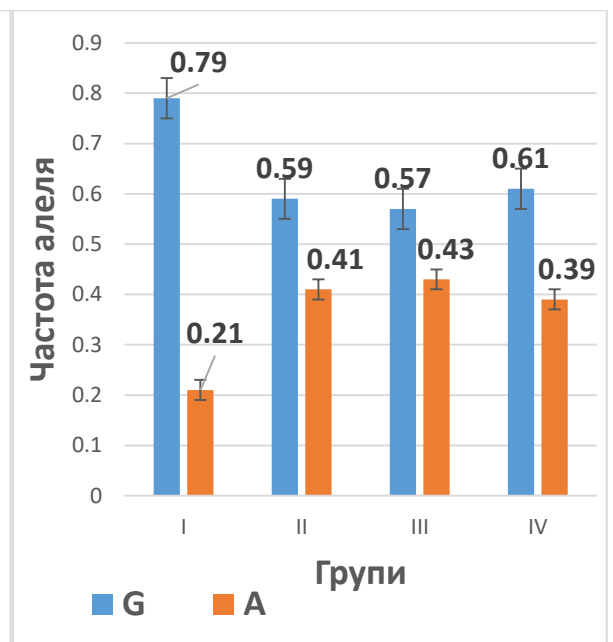
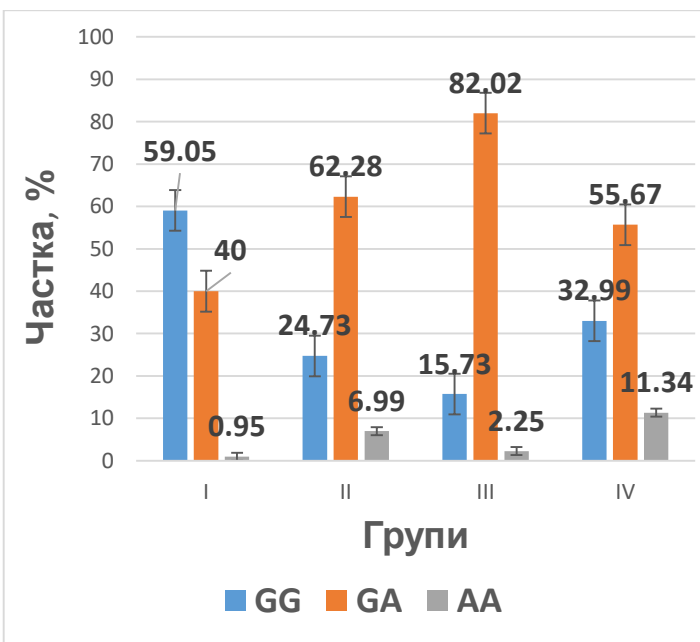


Рис. 3.1. Частоти генотипів та алелей поліморфних варіантів *rs11200638* гена *HTRA1* в досліджених групах

Частота гомозиготних за мінорним алелем (AA) осіб серед всіх хворих з ВМД була в 7,36 разів більшою, ніж в групі порівняння ($p = 0,02$). Причому, в групі пацієнтів з «вологою» формою ВМД – в 11,94 ($p = 0,002$) рази більшою, ніж в групі порівняння. Відмінності в частоті гомозиготних носіїв мінорного алеля між пацієнтами групи порівняння і хворими з «сухою» формою ВМД мали недостатній рівень статистичної значущості ($p = 0,47$). Частота носіїв мінорного алеля (A) в загальній групі хворих на ВМД була в 1,96 ($p < 0,0001$), в III групі – в 2,06 ($p < 0,0001$), в IV групі – в 1,87 разів більшою ($p < 0,0001$), ніж в групі порівняння.

Як видно з табл. 3.1 в загальній групі хворих на ВМД розподіл генотипів відрізнявся від рівноваги Харді-Вайнберга ($p < 0,0001$). Причому така невідповідність розподілу поліморфних варіантів *rs11200638* була характерною лише для пацієнтів з «сухою» формою ВМД ($p < 0,0001$), а не «вологою» ($p = 0,22$). В групі порівняння не виявлено статистично значущої відмінності розподілу генотипів від популяційної рівноваги, хоча можна припустити наявність тенденції до відхилення від розподілу Харді-Вайнберга – $p = 0,06$ (див. табл.3.1).

Відмінність розподілу генотипів від рівноваги Харді-Вайнберга в групі пацієнтів з «сухою» формою ВМД може бути обумовлена більшою часткою гетерозиготних носіїв поліморфних варіантів *rs11200638* за результатами генотипування, ніж теоретично очікуваних – 0,82 та 0,49, відповідно; та меншими частками гомозиготних носіїв, порівняно з теоретично очікуваними (див. табл.3.2). Привертає увагу, що частота гомозиготних носіїв за мінорним алелем (AA) в цій групі виявилось в 8,5 разів менше, ніж теоретично очікувана за умов популяційної рівноваги (0,022 та 0,187, відповідно).

Таблиця 3.2. Емпіричний та теоретично очікуваний (відповідно закону Харді-Вайнберга) розподіл генотипів *rs11200638* гена *HTRAI* в групі пацієнтів з «сухою» формою ВМД

Гентици	Емпірична частота	Теоретично очікувана частота	χ^2	p
	n = 89			
GG	0.157	0.322	24.26	< 0.0001
GA	0.820	0.491		
AA	0.022	0.187		

При порівнянні отриманих даних з даними літератури слід зазначити, що середньопопуляційна частота мінорного алеля (глобальна частота мінорного алеля, MAF) ОНП *rs11200638* в базах даних (напр. 1000 геномів) становить 0,21, а в популяціях Європи – 0,23, що співпадає з результатами генотипування осіб групи порівняння в наших дослідженнях. Порівняння розподілу генотипів *rs11200638* гена *HTRAI* в групі І та середньопопуляційних значень (представлених в базах даних) показано на рис. 3.2.

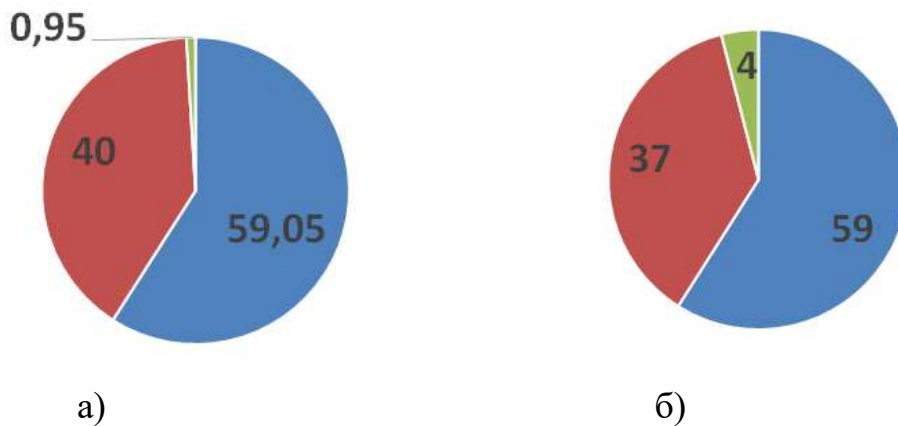


Рис. 3.2. Розподіл генотипів *rs11200638* гена *HTRAI* в групі порівняння (а) та представлений в базі даних 1000 геномів (б)

3.2. Аналіз асоціації поліморфізму rs11200638 гена *HTRA1* з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації (без врахування форми захворювання).

Аналіз асоціації поліморфізму rs1800629 гена *TNF* з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації (незалежно від форми захворювання) проводили з використанням алельної, адитивної, домінантної та рецесивної моделей успадкування, результати якого представлені в таблицях 3.3 -3.6.

Таблиця 3.3 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs11200638 гена *HTRA1*

Алелі	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	II група	I група			(відношення шансів)	
	n = 186	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G</i>	0.589	0.790	24.40	< 0.0001	0.38	0.26 – 0.56
<i>A</i>	0.411	0.210			2.64	1.78 – 3.90

Таблиця 3.4 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638 гена *HTRA1*. Адитивна модель успадкування.

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	II група	I група			(відношення шансів)	
	n = 186	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.247	0.590	34.71	< 0.0001	0.23	0.14 – 0.38
<i>G/A</i>	0.683	0.400			3.23	1.96 – 5.31
<i>A/A</i>	0.070	0.010			7.82	1.01 – 60.61

Таблиця 3.5 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638 гена *HTRA1*. Домінантна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	II група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 186	n = 105				
<i>G/G</i>	0.247	0.590	33.86	< 0.0001	0.23	0.14 – 0.38
<i>G/A + A/A</i>	0.753	0.410			4.39	2.63 – 7.32

Таблиця 3.6 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638 гена *HTRA1*. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	II група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 186	n = 105				
<i>G/G + G/A</i>	0.930	0.990	5.34	0.02	0.13	0.02 – 0.99
<i>A/A</i>	0.070	0.010			7.82	1.01 – 60.61

При аналізі асоціацій встановлено зв'язок поліморфізму rs11200638 гена *HTRA1* з ВМД. Відповідно до алельної моделі успадкування носійство варіантного алеля А ОНП rs11200638 збільшує ризик розвитку ВМД (без врахування форми захворювання) в 2,64 рази, $p < 0,0001$ (див. з табл. 3.3). Причому величина шансів розвитку патології залежить від алельного стану ОНП rs11200638. Гетерозиготний (GA) і гомозиготний (AA) за мінорним алелем генотипи є генетичними факторами схильності до данної патології, збільшуючи ризик її розвитку в 3,23 та 7,82 рази, відповідно, $p < 0,0001$ (див. з табл. 3.4). Гомозиготне носійство мажорного алеля (GG) має протекторний вплив щодо ризику розвитку ВМД – ВШ = 0,23, $p < 0,0001$ (див. табл.3.4-3.5).

3.3. Аналіз асоціації поліморфізму rs11200638 гена *HTRA1* з ризиком розвитку «сухої» і «вологої» форм вікової макулярної дегенерації

Патогенез «сухої» і «вологої» форм ВМД ще остаточно не з'ясовано. Існують як погляди щодо можливого розвитку «вологої» форми як ускладнення «сухої», так і докази, що обидві форми захворювання можуть мати різні механізми і метаболічні ланки патогенезу. Тому було проведено аналіз асоціації поліморфізму rs11200638 гена *HTRA1* з ризиком розвитку кожної форми ВМД окремо. Результати аналізу асоціації ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638 в різних моделях успадкування представлені в таблицях 3.7-3.10.

Таблиця 3.7. Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs11200638

Алелі	Частота		χ^2	p	ВШ	
	III група	I група			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G</i>	0.567	0.790	22.34	< 0.0001	0.35	0.22 – 0.54
<i>A</i>	0.433	0.210			2.88	1.84 – 4.49

Таблиця 3.8. Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638. Адитивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	p	ВШ	
	III група	I група			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.157	0.590	36.09	< 0.0001	0.13	0.06 – 0.26
<i>G/A</i>	0.820	0.400			6.84	3.51 – 13.34
<i>A/A</i>	0.022	0.010			2.39	0.21 – 26.82

Таблиця 3.9. Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638. Домінантна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	p	ВШ	
	III	I			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.157	0.590	37.93	< 0.0001	0.13	0.06 – 0.26
<i>G/A + A/A</i>	0.843	0.410			7.72	3.87 – 15.41

Таблиця 3.10 Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	p	ВШ	
	III	I			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G + G/A</i>	0.978	0.990	0.53	0.47	0.42	0.04 – 4.69
<i>A/A</i>	0.022	0.010			2.39	0.21 – 26.82

Результати аналізу свідчать про зв'язок поліморфізму rs11200638 гена *HTRA1* з «сухою» формою ВМД. Носійство мінорного алеля А ОНП rs11200638 збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД в 2,88 рази, $p < 0,0001$ (див. з табл. 3.7). Найбільші шанси захворіти в цій групі мали гетерозиготні за

зазначеним поліморфізмом особи – ВШ = 6,84, $p < 0,0001$ (див. табл. 3.8). У гомозигот за мінорним алелем (AA) ризик розвитку «сухої» форми ВМД збільшений в 2,39 рази, $p < 0,0001$ (див. табл. 3.8). Найбільший показник ВШ – 7,72, $p < 0,0001$ був в доміантній моделі успадкування (див. табл.3.9). Гомозиготне носійство мажорного алеля (GG) ОНП rs11200638 має протекторний вплив щодо ризику розвитку «сухої» форми ВМД: ВШ = 0,13 $p < 0,0001$ (див. табл. 3.9).

Результати аналізу асоціації ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638 в різних моделях успадкування представлені в таблицях 3.11-3.14.

Таблиця 3.11 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs11200638

Алелі	Групи		χ^2	p	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
Алель G	0.608	0.790	16.04	< 0.0001	0.41	0.27 – 0.64
Алель A	0.392	0.210			2.43	1.57 – 3.77

Таблиця 3.12 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638 . Адитивна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	p	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
G/G	0.330	0.590	18.61	< 0.0001	0.34	0.19 – 0.61
G/A	0.557	0.400			1.88	1.08 – 3.30
A/A	0.113	0.010			13.30	1.68– 105.10

Таблиця 3.13 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638 . Домінантна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.330	0.590	13.76	0.0002	0.34	0.19 – 0.61
<i>G/A + A/A</i>	0.670	0.410			2.93	1.65 – 5.20

Таблиця 3.14 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs11200638. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G + G/A</i>	0.887	0.990	9.74	0.002	0.08	0.01 – 0.59
<i>A/A</i>	0.113	0.010			13.30	1.68 – 105.10

Результати аналізу свідчать про зв'язок поліморфізму rs11200638 гена *HTRAI* також з «вологою» формою ВМД. Носійство мінорного алеля А ОНП rs11200638 збільшує ризик розвитку «вологої» форми ВМД в 2,43 рази, $p < 0,0001$ (див. з табл. 3.11). Проте, аналіз асоціації в інших моделях успадкування виявив відмінності в особливостях асоціації цього поліморфізму з розвитком «сухої» і вологої форм ВМД. Так, на відміну від асоціації із «сухою» формою, ризик розвитку «вологої» форми мав адитивний характер в залежності від кількості мінорних алелей ОНП rs11200638. У гетерозиготних (*GA*) за цим поліморфізмом осіб ризик розвитку «вологої» форми ВМД збільшувався в 1.88 разів, $p < 0,0001$, а у гомозиготних (*AA*) – в 13,3 рази, $p < 0,0001$, (див. з табл.

3.12). Гомозиготне носійство мажорного алеля (GG) також мало проєктивний характер щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД.

Метод аналізу кривих операційних характеристик (ROC – Receiver Operating Characteristic curve analysis) із визначенням площі під ROC-кривою (AUC – Area under the ROC curve) був використаний для додаткового визначення прогностичного значення поліморфних варіантів ОНП rs11200638 гена *HTRAI* щодо ризику розвитку ВМД (див. рис. 3.3)

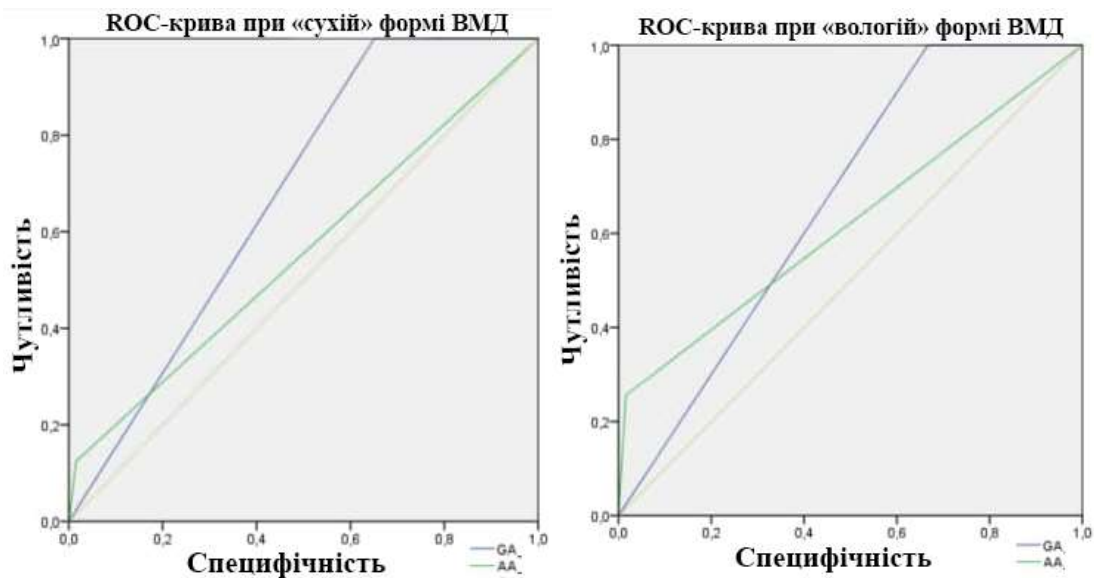


Рисунок 3.3 - ROC-криві для оцінки прогностичного значення поліморфних варіантів ОНП rs11200638 гена *HTRAI* в якості маркерів ризику розвитку «сухої» та «вологої» форм ВМД

Отримані значення AUC свідчили про задовільну ефективність використання поліморфізму як прогностичного фактора виникнення ВМД ($p < 0,05$). Встановлено, що найбільша прогностична значущість ОНП rs11200638 гена *HTRAI* має місце щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД. Зокрема, наявність генотипу GA має високу статистичну значущість

щодо розвитку «вологої» форми ВМД ($AUC=0,67\pm 0,05$ при 95% ДІ 0,57-0,77; $p<0,001$). Для гомозигот за мінорним алелем (AA) $AUC=0,62\pm 0,06$ (95% ДІ 0,51-0,73; $p<0,05$). Щодо ризику розвитку «сухої» форми ВМД висока статистична значущість була показана лише для гетерозиготного варіанту поліморфізму: $AUC=0,675\pm 0,064$ (95% ДІ 0,550-0,799; $p<0,001$). Показники специфічності та чутливості поліморфних варіантів rs11200638 гена *HTRA1* в якості прогностичних маркерів ризику розвитку ВМД представлені в таблиці 3.15.

Таблиця 3.15 - Чутливість і специфічність визначення поліморфізму rs11200638 гена *HTRA1* щодо ризику розвитку «сухої» та «вологої» форм ВМД

	Суха форма			Волога форма		
	GG	GA	AA	GG	GA	AA
Чутливість	–	83,9 %	12,5 %	–	62,8 %	25,6 %
Специфічність	–	59,6 %	98,4 %	–	59,2 %	98,4 %

Дані таблиці 3.15 вказують, що найкраща специфічність спостерігалась для гомозигот AA незалежно від форми захворювання й становила 98,4%, однак чутливість для даного варіанта поліморфізму rs11200638 була найгіршою – 12,5 % для «сухої» форми та 25,6 % для «вологої». Для гетерозиготного генотипу показник чутливості щодо ризику розвитку «сухої» форми становив 83,9 %, що було найвищим показником із отриманих результатів, а для «вологої» форми – 62,8%. Специфічність гетерозиготного носійства поліморфних варіантів rs11200638 в якості маркера ризику розвитку ВМД становила 59,6 % для «сухої» та 59,2 % для «вологої» форм захворювання.

Резюме

На підставі проведеного нами дослідження вперше в українській популяції була виявлена асоціація ОНП rs11200638 гена *HTRAI* з ризиком розвитком обох форм ВМД. Носійство мінорної алелі А підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2,88 разів (OR=2,88; 95 % ДІ 1.84 – 4.49), а «вологої» – в 2.43 рази (OR=2,43; 95% ДІ 1.57 – 3.77) ($p<0,001$). Носійство генотипу GA збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 6,84 разів (OR=6,84; 95 % ДІ 3.51 – 13.34), а «вологої» – у 1.88 рази (OR=1.88; 95 % ДІ 1.08 – 3.30) ($p<0,01$). Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) підвищує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.39 рази (OR=2.39; 95 % ДІ 0.21 – 26.82) ($p<0,001$), «вологої» форми ВМД у 13.30 рази (OR=13.30; 95 % ДІ 1.68–105.10) ($p<0,001$).

Даний розділ висвітлений у матеріалах наступних публікацій здобувача:
[153].

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ rs1061170 ГЕНА *CFH* З РОЗВИТКОМ
ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ**4.1 Розподіл генотипів та частота алелей поліморфних варіантів поліморфізму rs1061170 гена *CFH* у пацієнтів з ВМД та в групі порівняння.**

З метою дослідження асоціації поліморфних варіантів *rs1061170* гена *CFH* з розвитком вікової макулярної дегенерації в популяції Поділля було проаналізовано розподіл генотипів та алелей за цим поліморфізмом у пацієнтів без ВМД (група порівняння) – 105 осіб, у пацієнтів загальної групи хворих на ВМД (група II) – 186 осіб, а також у пацієнтів з різними формами патології – у хворх на «суху» (група III) – 89 осіб, і «вологу» (група IV) – 97 осіб, форми ВМД.

Результати генотипування в досліджених групах та відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга представлені в таблиці 4.1. В усіх групах хворих розподіл генотипів не відрізнявся від рівноваги Харді-Вайнберга ($p > 0,05$).

Частота зустрічальності генотипів групі порівняння становила: TT – 56,19%, TC – 37,14 % CC – 6,67%; частота мінорного алеля (C) – 0,25. Частота зустрічальності генотипів в загальній групі хворх на ВМД: TT – 24,6%, TT – 24,6%, TC – 48,66%; частота мінорного алеля (C) – 0,51. Частота зустрічальності генотипів в групі пацієнтів с «сухою» формою ВМД: TT – 29,22%, TC – 53,93% CC – 16,85%; частота мінорного алеля (C) – 0,44. Частота зустрічальності генотипів в групі пацієнтів с «вологою» формою ВМД: : TT – 20,62%, TC – 44,33%, CC – 35,05%; частота мінорного алеля (C) – 0,57 (див. рис. 4.1).

Таблиця 4.1 - Розподіл генотипів за поліморфізмом rs1061170 гена *CFH* та його відповідність закону Харді-Вайнберга у хворих на ВМД та в групі порівняння

Група дослідження	Генотипи			Відповідність рівновазі Харді-Вайнберга	
	ТТ	ТС	СС	χ^2	p
I (група порівняння)	59	39	7	0.01	0.93
II (всі хворі на ВМД)	46	91	49	0.04	0.84
III (суха форма ВМД)	26	48	15	0.37	0.54
IV (волога форма ВМД)	20	43	34	0.34	0.56

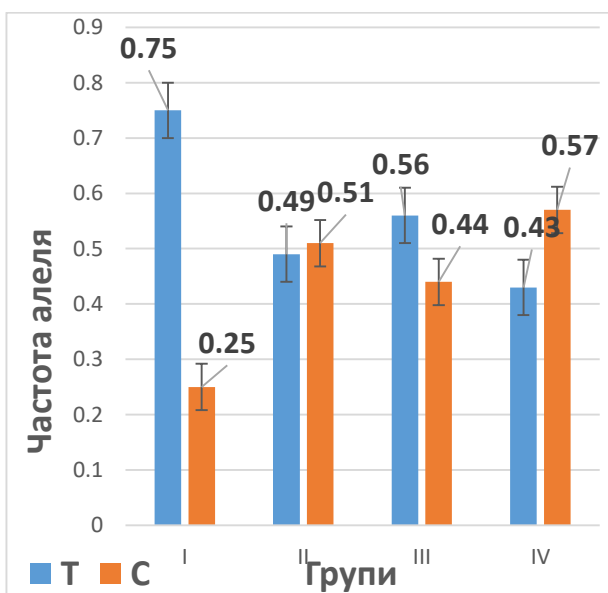
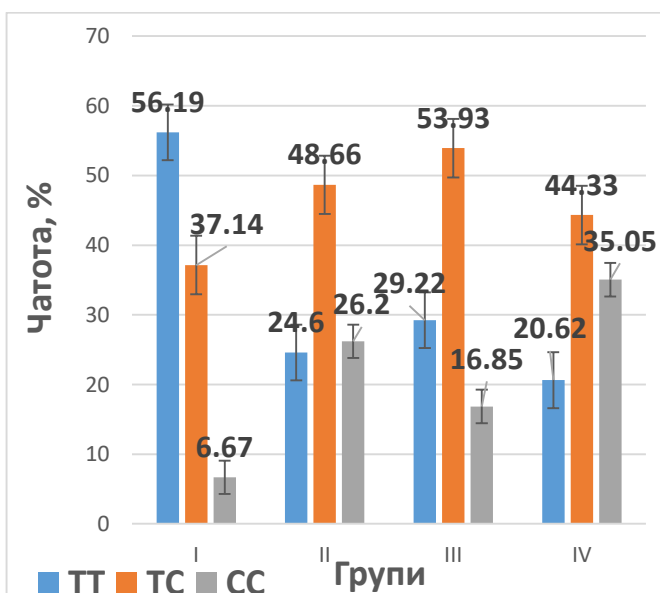


Рис. 4.1. Частоти генотипів та алелей поліморфних варіантів rs1061170 гена *CFH* в досліджених групах

В усіх групах розподіл генотипів відповідав рівновазі Харді-Вайнберга (див. табл. 4.1.).

Частота гомозиготних за мінорним алелем (CC) осіб серед всіх хворих на ВМД була в 3,93 рази більшою, ніж в групі порівняння ($p < 0.0001$). В групі пацієнтів з «сухою» формою ВМД частота гомозиготних за мінорним алелем пацієнтів була в 2,53 ($p = 0.0001$), а в групі з «вологою» формою ВМД – в 5,26 ($p < 0.0001$) разів більшою, ніж в групі порівняння.

Частота носіїв мінорного алеля (C) в загальній групі хворих на ВМД була в 2,04 ($p < 0,0001$), в III групі – в 1,76 ($p = 0,0001$), в IV групі – в 2,28 разів більшою ($p < 0,0001$), ніж в групі порівняння.

Середньопопуляційна частота мінорного алеля C (глобальна частота мінорного алеля, MAF) ОНП rs1061170 в базах даних (напр. 1000 геномів) становить 0,27. Це співпадає з отриманими нами результатами генотипування осіб групи порівняння мешканців Поділля України: частота мінорного алеля C – 0,25. Разом з тим, слід зазначити, що розподіл частот поліморфних варіантів ОНП rs1061170 в різних популяціях світу суттєво відрізняється. Так частота мінорного алеля C в популяціях Європи становить 0,36, Північної Америки – 0,23, Південної Азії – 0,29, Східної Азії – 0,048. Порівняння розподілу генотипів rs1061170 гена *CFH* в групі I та середньопопуляційних значень (представлених в базах даних) показано на рис. 4.2.

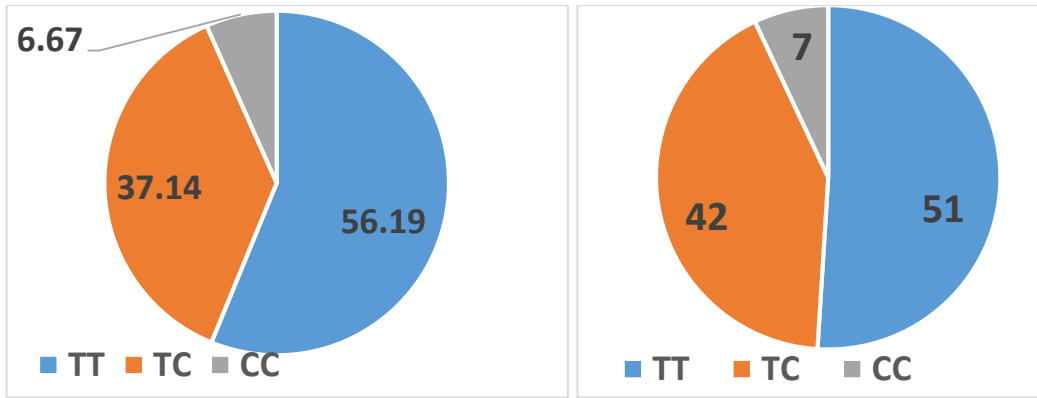


Рис. 4.2. Розподіл генотипів *rs1061170* гена *CFH* в групі порівняння (а) та представлений в базі даних 1000 геномів (б)

Таким чином, отримані результати свідчать, що частота алелей та генотипів ОНП *rs1061170* гена *CFH* в дослідженій групі мешканців України Подільського регіону співпадають з частотою поліморфних варіантів цього ОНП в популяціях Європи.

4.2 Аналіз асоціації поліморфізму *rs1061170* гена *CFH* з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації

Аналіз асоціації поліморфізму *rs1061170* гена *CFH* з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації (незалежно від форми захворювання) проводили з використанням алельної, адитивної, домінантної та рецесивної моделей успадкування, результати якого представлені в таблицях 4.2 - 4.5.

Алелі	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	II група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 186	n = 105				
<i>T</i>	0.492	0.748	36.12	< 0.0001	0.33	0.23 – 0.47
<i>C</i>	0.508	0.252			3.06	2.11 – 4.44

Таблиця 4.2 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством варіантних алелей ОНП *rs1061170*

Таблиця 4.3 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170 . Адитивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	II група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 186	n = 105				
<i>T/T</i>	0.247	0.562	33.43	< 0.0001	0.26	0.15 – 0.43
<i>T/C</i>	0.489	0.371			1.62	0.99 – 2.64
<i>C/C</i>	0.263	0.067			5.01	2.18 – 11.52

Таблиця 4.4 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170. Домінантна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	n = 186	n = 105			значення	95 % ДІ
	<i>T/T</i>	0.247				
<i>T/C + C/C</i>	0.753	0.438	3.90	2.35 – 6.50		

Таблиця 4.5 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	II група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 186	n = 105				
<i>T/T + T/C</i>	0.737	0.933	16.7	< 0.0001	0.20	0.09 – 0.46
<i>C/C</i>	0.263	0.067			5.01	2.18 – 11.52

В усіх моделях успадкування виявлено встановлено зв'язок поліморфізму rs1061170 гена *CFH* з ВМД. Відповідно до алельної моделі

успадкування носійство варіантного алеля С ОНП rs1061170 збільшує ризик розвитку ВМД (без врахування форми захворювання) в 3,06 рази, $p < 0,0001$ (див. з табл. 4.2). Як видно з табл. 4.3. величина шансів розвитку патології залежить від алельного стану ОНП rs1061170. Гетерозиготний (ТС) і гомозиготний (СС) за мінорним алелем генотипи є генетичними факторами схильності до данної патології, збільшуючи ризик її розвитку в 1,62 та 5,01 рази, відповідно, $p < 0,0001$. Гомозиготне носійство мажорного алеля (ТТ) має протекторний вплив щодо ризику розвитку ВМД – ВШ = 0,26, $p < 0,0001$ (див. табл.4.3-4.4).

4.3. Аналіз асоціації поліморфізму rs1061170 гена *CFH* з ризиком розвитку «сухої» і «волової» форм вікової макулярної дегенерації

Результати аналізу асоціації ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170 гена *CFH* в різних моделях успадкування представлені в таблицях 4.6-4.9.

Таблиця 4.6 Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs1061170

Алелі	Групи		χ^2	p	ВШ (відношення шансів)	
	III	I			значення	95 % ДІ
	n = 89	n = 105				
Алель T	0.562	0.748	14.88	0.0001	0.43	0.28 – 0.67
Алель C	0.438	0.252			2.31	1.50 – 3.55

Таблиця 4.7. Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170 гена *CFH*

Генотипи	Групи		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	III	I			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>T/T</i>	0.292	0.562	14.91	0.0001	0.32	0.18 – 0.59
<i>T/C</i>	0.539	0.371			1.98	1.12 – 3.52
<i>C/C</i>	0.169	0.067			2.84	1.10 – 7.31

Таблиця 4.8 Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170. Домінантна модель

Генотипи	Групи		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	III	I			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>T/T</i>	0.292	0.562	14.24	0.0002	0.32	0.18 – 0.59
<i>T/C + C/C</i>	0.708	0.438			3.11	1.71 – 5.65

Таблиця 4.9 Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	III	I			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>T/T + T/C</i>	0.831	0.933	4.97	0.03	0.35	0.14 – 0.91
<i>C/C</i>	0.169	0.067			2.84	1.10 – 7.31

Результати аналізу свідчать про зв'язок поліморфізму rs1061170 гена гена *CFH* з «сухою» формою ВМД. Так, носійство мінорного алеля С збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД в 2,31 рази, $p = 0,0001$ (див. з табл. 4.6).

Найбільші шанси захворіти в цій групі мали гомозиготні за мінорним алелем особи – ВШ = 2,84, $p = 0,0001$ (див. табл. 4.7). У гетерозигот (ТС) ризик розвитку «сухої» форми ВМД збільшений в 1,98 рази, $p = 0,0001$ (див. табл. 3.8). Тобто асоціація поліморфізму rs1061170 гена *CFH* з «сухою» формою ВМД має адитивний характер – збільшується із збільшенням кількості мінорних алелей.

Найбільший показник ВШ – 3,11, $p = 0,0002$ був в домінантній моделі успадкування (див. табл.4.8). Гомозиготне носійство мажорного алеля (ТТ) має протекторний вплив щодо ризику розвитку «сухої» форми ВМД: ВШ = 0,32 $p < 0,05$ (див. табл. 4.8).

Результати аналізу асоціації ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170 гена *CFH* в різних моделях успадкування представлені в таблицях 4.10-4.13.

Таблиця 4.10 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs1061170

Алелі	Групи		χ^2	p	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>T</i>	0.428	0.748	42.76	< 0.0001	0.25	0.17 – 0.38
<i>C</i>	0.572	0.252			3.96	2.60 – 6.04

Таблиця 4.11 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170 . Адитивна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	p	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>T/T</i>	0.206	0.562	36.92	< 0.0001	0.20	0.11 – 0.38
<i>T/C</i>	0.443	0.371			1.35	0.77 – 2.37
<i>C/C</i>	0.351	0.067			7.56	3.16 – 18.09

Таблиця 4.12 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170. Домінантна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	p	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>T/T</i>	0.206	0.562	26.7	< 0.0001	0.20	0.11 – 0.38
<i>T/C + C/C</i>	0.794	0.438			4.94	2.64 – 9.23

Таблиця 4.13 Асоціація ризику «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1061170. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	p	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>T/T + T/C</i>	0.649	0.933	25.1	< 0.0001	0.13	0.06 – 0.32
<i>C/C</i>	0.351	0.067			7.56	3.16 – 18.09

Результати аналізу свідчать про зв'язок поліморфізму rs1061170 гена *CFH* з «вологою» формою ВМД. Носійство мінорного алеля С збільшує ризик розвитку «вологої» форми ВМД в 3,96 рази, $p < 0,0001$ (див. з табл. 4.10). Як і у випадку щодо «сухої» форми ВМД, асоціація носійства мінорного алеля з ризиком розвитку «вологої» форми патології мала адитивний характер (див.табл. 4.11). Проте, ризик розвитку «вологої» форми ВМД при наявності гомозиготного за мінорним алелем генотипу ($ВШ = 7,56$, $p < 0,0001$) був більший, ніж ризик розвитку «сухої» форми захворювання (див. табл. 4.7. та 4.11). Гетерозиготне носійство мінорного алеля лише в 1,35 збільшувало ризик розвитку «вологої» форми ВМД. Гомозиготне носійство мажорного алеля (ТТ) також мало проєктивний характер щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД – $ВШ = 0,20$, $p < 0,0001$ (див. табл.4.12).

Для визначення прогностичної значущості поліморфізму rs1061170 гена *CFH* в якості маркеру ризику розвитку ВМД проводили аналіз ROC-кривих розрахунком площі під нею (AUC) (див. рис. 4.3).

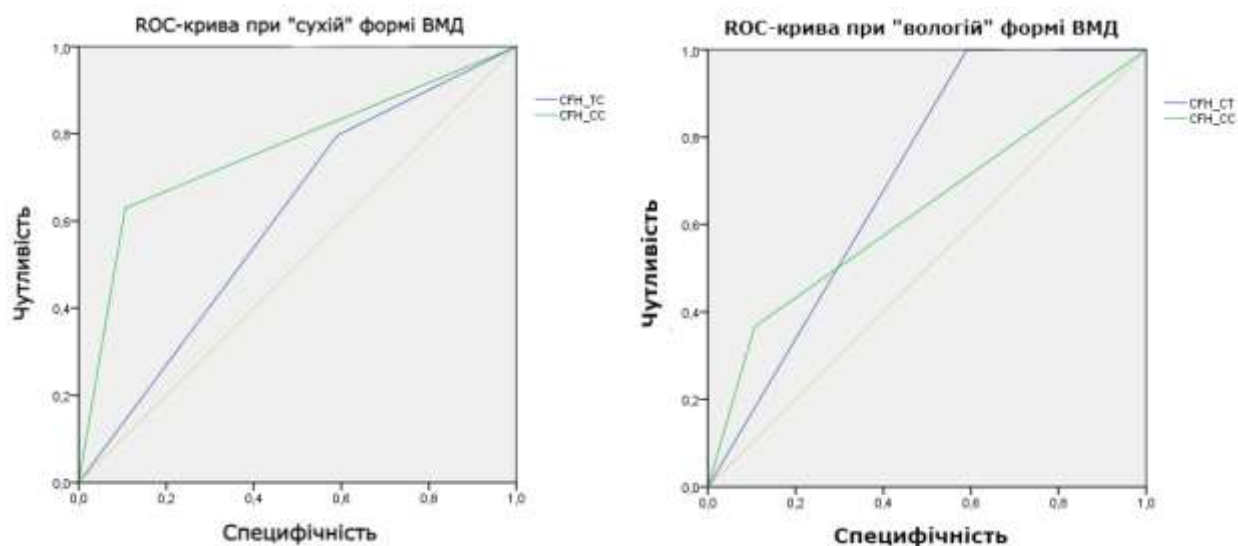


Рис. 4.3 - ROC-криві для оцінки прогностичного значення поліморфних варіантів ОНП rs1061170 гена *CFH* в якості маркерів ризику розвитку «сухої» та «вологої» форм ВМД

Отримані значення AUC свідчили про добру ефективність використання поліморфізму як прогностичного маркера ризику розвитку ВМД ($p < 0,05$). Носійство генотипу ТС має хорошу передбачувальну здатність (згідно з експертною шкалою значень AUC) при виникненні «сухої» форми ВМД ($AUC = 0,705 \pm 0,049$ при 95 % ДІ 0,609-0,801; $p < 0,001$), тоді як при «вологій» формі показники AUC мали недостатній рівень статистичної значущості ($p > 0,05$). Водночас значення AUC при генотипі СС в обох формах ВМД були статистично значущими ($p < 0,05$) і вказували на хорошу передбачувальну здатність при «вологій» формі захворювання ($AUC = 0,762 \pm 0,046$ при 95 % ДІ 0,671-0,852; $p < 0,001$) і на задовільну – при сухій ($AUC = 0,630 \pm 0,058$ при 95 % ДІ 0,517-0,743; $p < 0,05$).

Показники специфічності та чутливості поліморфних варіантів rs1061170 гена *CFH* в якості прогностичних маркерів ризику розвитку ВМД представлені в таблиці 4.14.

Таблиця 4.14 - Чутливість і специфічність визначення поліморфізму rs1061170 гена *CFH* щодо ризику розвитку «сухої» та «вологої» форм ВМД.

	Суха форма			Волога форма		
	ТТ	ТС	СС	ТТ	ТС	СС
Чутливість		64,9%	36,6%	–	67,2%	63,0%
Специфічність		60,2%	89,4%	–	60,2%	89,4%

Отримані дані (див. табл. 4.14) дозволяють резюмувати, що при обох формах захворювання чутливість генотипу СС, який мав найкращу прогностичну значущість за результатами аналізу ROC-кривої, виявилась найгіршою і складала 36,6 % при «сухій» формі захворювання і 63 % – при

«вологій», тоді як специфічність визначення цього алельного варіанту була найвищою при обох формах ВМД і становила 89,4 %. Низькі показники чутливості та велика різниця у порівнянні зі специфічністю можуть бути пов'язані із мультифакторіальністю патології та свідчать про вплив інших факторів на її розвиток та прогресування. В той самий час, генотип ТС міг з безпомилковим прогнозом у 64,9 % випадків підтвердити розвиток «сухої» форми захворювання, а вологої – у 67,2 %, тоді як специфічність його виявлення при обох формах хвороби складала 60,2%, що свідчить про адекватну діагностичну цінність виявлення цього генотипу для підтвердження наявності в нього ВМД.

Резюме

За результатами дослідження вперше в українській популяції була виявлена асоціація ОНП rs1061170 гена *CFH* з розвитком обох форм ВМД. Носійство мінорної алелі С підвищує шанси виникнення «сухої» форми захворювання у 2,31 рази (OR=2,31; 95 % ДІ 1,5-3,55), а «вологої» – у 3,96 рази (OR=3,96; 95 % ДІ 2,59-6,04) ($p<0,001$). Носійство гетерозиготного генотипу (ТС) підвищує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 1.98 рази (OR=1.98; 95 % ДІ 1.12–3.52), а «вологої» – у 1.35 рази (OR=1.35; 95 % ДІ 0.77 – 2.37) ($p<0,001$). Водночас генотип СС збільшує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.84 рази (OR= 2.84; 95 % ДІ 1.10 – 7.31), а «вологої» – у 7.56 рази (OR=7.56; 95 % ДІ 3.16 – 18.09) ($p<0,001$).

Даний розділ висвітлений у матеріалах наступних публікацій здобувача:
[151, 156]

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ ПОЛІМОРФІЗМУ rs1800629 ГЕНА TNF З РОЗВИТКОМ ВІКОВОЇ МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ**3.1 Розподіл генотипів та частота алелей поліморфних варіантів rs1800629 гена TNF у пацієнтів з ВМД та в групі порівняння.**

З метою дослідження асоціації поліморфних варіантів rs1800629 гена TNF з розвитком вікової макулярної дегенерації в популяції Поділля було проаналізовано розподіл генотипів та алелей за цим поліморфізмом у пацієнтів без ВМД (група порівняння) – 105 осіб, у пацієнтів загальної групи хворих на ВМД (група II) – 186 осіб, а також у пацієнтів з різними формами патології – у хворх на «суху» (група III) – 89 осіб, і «вологу» (група IV) – 97 осіб, форми ВМД.

Результати генотипування в досліджених групах та відповідність розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга представлені в таблиці 5.1. Частота зустрічальності генотипів групі порівняння становила: GG – 64,76%, GA – 32,38 % AA – 2,86%; частота мінорного алеля (A) – 0,19. Частота зустрічальності генотипів в загальній групі хворх на ВМД: GG – 31,72%, GA – 61,29%, AA – 6,99%; частота мінорного алеля (A) – 0,38. Частота зустрічальності генотипів в групі пацієнтів с «сухою» формою ВМД: GG – 35,96%, GA – 56,18%, AA – 7,86%; частота мінорного алеля (A) – 0,36. Частота зустрічальності генотипів в групі пацієнтів з «вологою» формою ВМД: GG – 27,84 %, GA – 65,98%, AA – 6,18 %; частота мінорного алеля (A) – 0,39 (див. рис. 5.1).

Таблиця 5.1 - Розподіл генотипів поліморфізму rs1800629 гена TNF у хворих із «сухою» і «вологою» формами ВМД та контрольною групою.

Група дослідження	Генотипи			Відповідність рівновазі Харді-Вайнберга	
	GG	GA	AA	χ^2	p
I (група порівняння)	68	34	3	0.21	0.65
II (всі хворі на ВМД)	59	114	13	9.25	0.002
III (суха форма ВМД)	32	50	7	2.56	0.11
IV (волога форма ВМД)	27	64	6	8.09	0.004

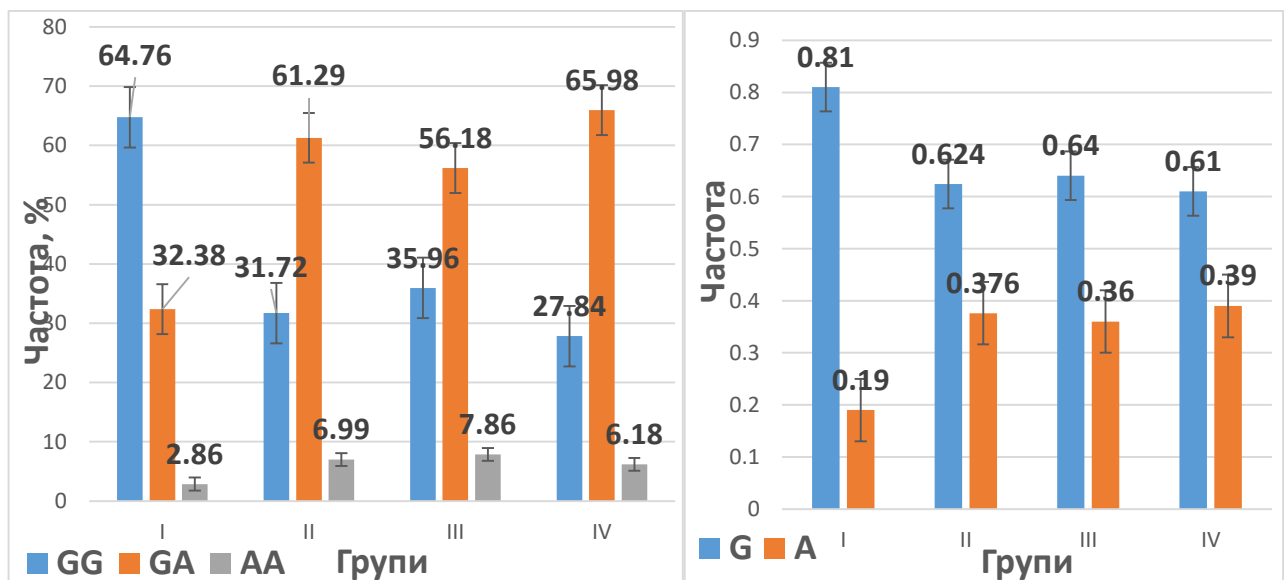


Рисунок 5.1. Частоти генотипів та алелей поліморфних варіантів rs1800629 гена TNF в досліджених групах

Як видно з табл. 5.1 в загальній групі хворих на ВМД розподіл генотипів відрізнявся від рівноваги Харді-Вайнберга ($p = 0,002$). Причому така невідповідність розподілу поліморфних варіантів rs1800629 була характерною лише для пацієнтів з «вологою» формою ВМД ($p = 0,004$), а не «сухою» ($p = 0,11$). В групі порівняння розподіл генотипів відповідав рівновазі Харді-Вайнберга – $p = 0,65$ (див. табл.3.1).

Середньопопуляційна частота мінорного алеля А (глобальна частота мінорного алеля, MAF) ОНП rs1800629 в базах даних (напр. 1000 геномів) становить 0,15. В наших дослідженнях за результатами генотипування осіб групи порівняння мешканців Поділля України частота мінорного алеля А становила – 0,19. В популяціях Європи частота мінорного алеля становить 0,16, в популяціях Африки – 0,12, серед афро-американців – 0,21, а в популяціях Східної Азії – 0,075. Порівняння розподілу генотипів *rs1800629* гена *TNF* в групі порівняння та середньопопуляційних значень (представлених в базах даних) показано на рис. 5.2.

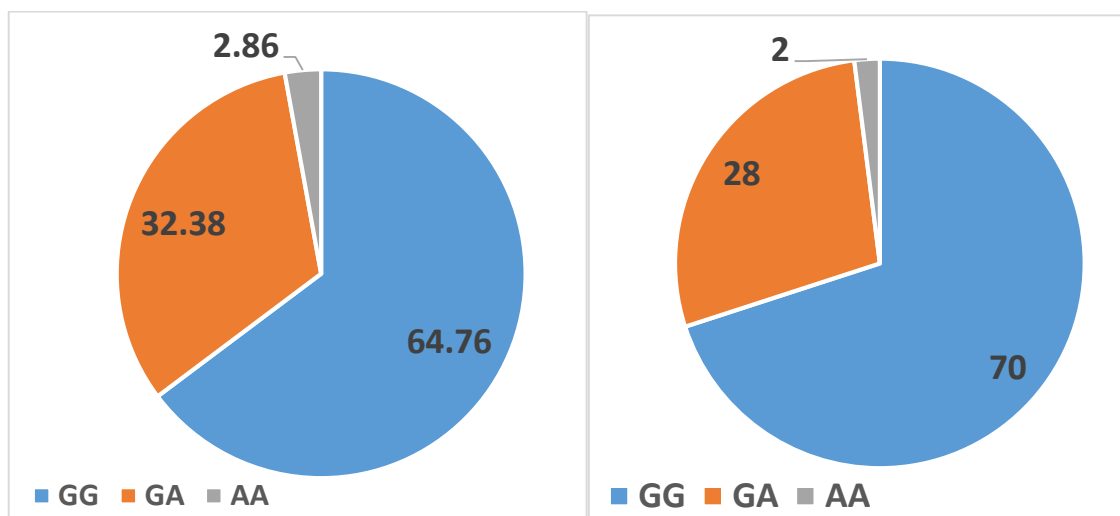


Рис. 5.2. Розподіл генотипів rs1800629 гена *TNF* в групі порівняння (а) та представлений в базі даних 1000 геномів (б)

5.2. Аналіз асоціації поліморфізму rs1800629 гена *TNF* з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації

Аналіз асоціації поліморфізму rs1800629 гена *TNF* з ризиком розвитку вікової макулярної дегенерації (незалежно від форми захворювання) проводили з використанням алельної, адитивної, домінантної та рецесивної моделей успадкування, результати якого представлені в таблицях 5.2 -5.5.

Таблиця 5.2 Асоціація ризику розвитку ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs1800629

Алелі	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	II група	I група			(відношення шансів)	
	n = 186	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G</i>	0.624	0.810	21.71	< 0.0001	0.39	0.26 – 0.58
<i>A</i>	0.376	0.190			2.56	1.71 – 3.84

Таблиця 5.3 Асоціація ризику ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629 Адитивна модель успадкування.

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	II група	I група			(відношення шансів)	
	n = 186	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.317	0.317	26.81	< 0.0001	0.25	0.15 – 0.42
<i>G/A</i>	0.613	0.613			3.31	2.00 – 5.47
<i>A/A</i>	0.070	0.070			2.55	0.71 – 9.18

Таблиця 5.4 Асоціація ризику ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629. Домінантна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	II група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 186	n = 105				
<i>G/G</i>	0.317	0.648	29.79	< 0.0001	0.25	0.15 – 0.42
<i>G/A + A/A</i>	0.683	0.352			3.96	2.39 – 6.56

Таблиця 5.5 Асоціація ризику ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ (відношення шансів)	
	II група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 186	n = 105				
<i>G/G + G/A</i>	0.930	0.971	2.21	0.14	0.39	0.11 – 1.41
<i>A/A</i>	0.070	0.029			2.55	0.71 – 9.18

Відповідно до алельної моделі успадкування носійство варіантного алеля А ОНП rs1800629 збільшує ризик розвитку ВМД (без врахування форми захворювання) в 2,56 рази, $p < 0,0001$ (див. з табл. 5.2). Ризик розвитку ВМД не залежав від алельного статусу мінорного алеля – для гетерозиготних за цим поліморфізмом носіїв ВШ = 3,31 ($p < 0.0001$), а для гомозигот за мінорним алелем ВШ = 2,55 ($p < 0.0001$) (див. табл. 5.3). Таким чином і гетерозиготний (GA) і гомозиготний (AA) генотипи в адитивній, домінантній і рецесивній

моделях успадкування є генетичними факторами схильності до данного захворювання.

5.3. Аналіз асоціації поліморфізму rs1800629 гена *TNF* з ризиком розвитку «сухої» і «вологої» форм вікової макулярної дегенерації

Результати аналізу асоціації ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629 гена *TNF* в різних моделях успадкування представлені в таблицях 5.6-5.9.

Таблиця 5.6. Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs1800629

Алелі	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	III група	I група			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G</i>	0.640	0.810	14.04	0.0002	0.42	0.26 – 0.66
<i>A</i>	0.360	0.190			2.39	1.50 – 3.78

Таблиця 5.7. Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629 . Адитивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	III група	I група			(відношення шансів)	
	n = 89	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.360	0.648	15.66	< 0.0001	0.31	0.17 – 0.55
<i>G/A</i>	0.562	0.324			2.68	1.49 – 4.81
<i>A/A</i>	0.079	0.029			2.90	0.73 – 11.58

Таблиця 5.8. Асоціація ризику розвитку «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629 . Домінантна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	p	ВШ (відношення шансів)	
	III група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 89	n = 105				
<i>G/G</i>	0.360	0.360	16.0	< 0.0001	0.31	0.17 – 0.55
<i>G/A + A/A</i>	0.640	0.640	0		3.27	1.82 – 5.90

Таблиця 5.9 Асоціація ризику «сухої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	p	ВШ (відношення шансів)	
	III група	I група			значення	95 % ДІ
	n = 89	n = 105				
<i>G/G + G/A</i>	0.921	0.971	2.47	0.12	0.34	0.09 – 1.37
<i>A/A</i>	0.079	0.029			2.90	0.73 – 11.58

Результати аналізу свідчать про зв'язок поліморфізму rs1800629 гена TNF з «сухою» формою ВМД. Носійство мінорного алеля А збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД в 2,39 рази, $p = 0,0002$ (див. табл. 5.6). І гетерозиготні і гомозиготні за мінорним алелем особи мали співставимі шанси розвитку «сухої» форми ВМД – ВШ = 2,68 ($p < 0.0001$) та 2,90 ($p < 0.0001$), відповідно (див. табл. 457). Гомозиготне носійство мажорного алеля (GG) має протекторний вплив щодо ризику розвитку «сухої» форми ВМД: ВШ = 0,31 $p < 0,05$ (див. табл. 5.7-5.8).

Результати аналізу асоціації ризику розвитку «вологоді» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629 гена *TNF* в різних моделях успадкування представлені в таблицях 5.10-5.13.

Таблиця 5.10 Асоціація ризику розвитку «вологоді» форми ВМД з носійством варіантних алелей ОНП rs1800629

Алелі	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	IV група	I група			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
Алель <i>G</i>	0.608	0.810	19.96	< 0.0001	0.37	0.23 – 0.57
Алель <i>A</i>	0.392	0.190			2.74	1.75 – 4.29

Таблиця 5.11 Асоціація ризику розвитку «вологоді» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629. Адитивна модель успадкування

Генотипи	Частота		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	IV група	I група			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.278	0.648	24.49	< 0.0001	0.21	0.12 – 0.38
<i>G/A</i>	0.660	0.324			4.05	2.25 – 7.28
<i>A/A</i>	0.062	0.029			2.24	0.54 – 9.22

Таблиця 5.12 Асоціація ризику розвитку «вологоді» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629. Домінантна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G</i>	0.278	0.648	27.60	< 0.0001	0.21	0.12 – 0.38
<i>G/A + A/A</i>	0.722	0.352			4.76	2.62 – 8.66

Таблиця 5.13 Асоціація ризику розвитку «вологої» форми ВМД з носійством поліморфних варіантів ОНП rs1800629. Рецесивна модель успадкування

Генотипи	Групи		χ^2	<i>p</i>	ВШ	
	IV	I			(відношення шансів)	
	n = 97	n = 105			значення	95 % ДІ
<i>G/G + G/A</i>	0.938	0.971	1.31	0.25	0.45	0.11 – 1.84
<i>A/A</i>	0.062	0.029			2.24	0.54 – 9.22

Носійство мінорного алеля А збільшує також і ризик розвитку «вологої» форми ВМД - в 2,774 рази, $p < 0,0001$ (див. з табл. 5.10). Найбільші шанси захворіти в цій групі мали гетерозиготні за зазначеним поліморфізмом особи – ВШ = 4,05, $p < 0,0001$ (див. табл. 5.11). У гомозигот за мінорним алелем (АА) ризик розвитку «вологої» форми ВМД збільшений в 2,24 рази, $p < 0,0001$ (див. табл. 5.11). Найбільший показник ВШ – 4,76, $p < 0,0001$ був в домінантній моделі успадкування (див. табл.5.12). Гомозиготне носійство мажорного алеля (ТТ) також мало протективний характер щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД – ВШ = 0,21, $p < 0,0001$ (див. табл.5.11-5.12).

Для визначення прогностичної значущості поліморфізму rs1800629 гена *TNF* в якості маркеру ризику розвитку ВМД проводили аналіз ROC-кривих розрахунком площі під нею (AUC) (див. рис. 5.3).

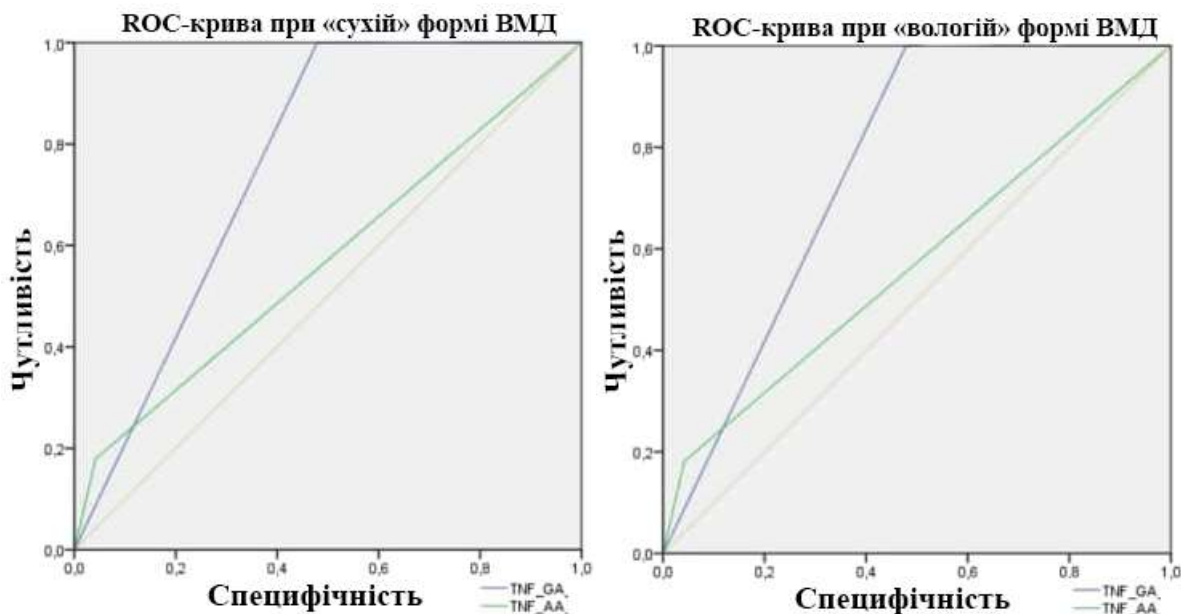


Рисунок 5.3 - ROC-криві для оцінки прогностичного значення поліморфних варіантів ОНП rs1800629 гена *TNF* в якості маркерів ризику розвитку «сухої» та «вологої» форм ВМД

Носійство гетерозиготного генотипу GA демонструє високу статистичну значущість щодо розвитку як «сухої» ($AUC=0,761\pm 0,044$ при 95 % ДІ 0,674-0,847; $p<0,001$), так і «вологої» ($AUC=0,761\pm 0,045$ при 95 % ДІ 0,672-0,849; $p<0,001$) форм ВМД. Показники специфічності та чутливості поліморфних варіантів rs1800629 в якості прогностичних маркерів ризику розвитку ВМД представлені в таблиці 5.14.

Таблиця 5.14 - Чутливість і специфічність визначення поліморфізму rs1800629 гена *TNF* при розвитку «сухої» та «вологої» форм ВМД

	Суха форма			Волога форма		
	GG	GA	AA	GG	GA	AA
Чутливість	–	61,0%	17,9%	–	70,3%	18,2%
Специфічність	–	66,7%	95,8%	–	66,7%	95,8%

Резюме

Таким чином, в ході роботи вперше в Україні, в популяції мешканців Поділля була встановлена асоціація ОНП rs1800629 гена *TNF* з розвитком обох форм ВМД. Носійство мінорної алелі А підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2.39 рази (OR=2.39 ; 95 % ДІ 1.75 – 4.29), а «вологої» – в 2.74 рази (OR= 2.74; 95 % ДІ 1.75 – 4.29) ($p<0,001$). Носійство гетерозиготного варіанту поліморфізму (GA) підвищує ризик виникнення «сухої» форми ВМД у 2.68 рази (OR=2.68 ; 95 % ДІ 1.49 – 4.81), а неоваскулярної форми – у 4.05 рази (OR= 4.05; 95 % ДІ 2.25 – 7.28) ($p<0,001$). Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) збільшує шанс виникнення «сухої» форми патології у 2.90 рази (OR= 2.90; 95 % ДІ 0.73 – 11.58), а «вологої» – у 2.24 рази (OR=2.24; 95 % ДІ 0.54 – 9.22) ($p<0,05$).

Даний розділ висвітлений у матеріалах наступних публікацій здобувача:

[152, 157].

РОЗДІЛ 6
ДОСЛІДЖЕННЯ АСОЦІАЦІЇ КОМБІНАЦІЙ
ОДНОНУКЛЕОТИДНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ *CFH* (rs1061170),
***HTRA1* (rs11200638) ТА *TNF* (rs1800629) З РОЗВИТКОМ ВІКОВОЇ**
МАКУЛЯРНОЇ ДЕГЕНЕРАЦІЇ

Враховуючи виявлені статистично значущі асоціації усіх досліджуваних поліморфізмів з ризиком розвитку різних форм ВМД, додатково було проаналізовано ступінь асоціації комбінації генотипів цих поліморфізмів з розвитком захворювання.

При наявності комбінації усіх 3 SNP теоретично можливими є утворення 27 їх варіантів (3³), але у результаті генотипування серед всіх пацієнтів було виявлено всього 23 комбінації генотипів (див. рис. 6.1).

HTRA → CFH ↓	1	½	2	TNF ↓	HTRA → CFH ↓	1	½	2	TNF ↓
1	8(3/5)	12(9/3)	1(0/1)	1	1	21	16		1
	6(2/4)	18(12/6)	1(0/1)	½		19	2		½
				2			1		2
½	8(5/3)	18(11/7)	1(0/1)	1	½	10	15	1	1
	11(3/8)	41(24/17)	5(1/4)	½		7	4		½
	1(1/0)	5(3/2)	1(0/1)	2		2			2
2	2(0/2)	9(4/5)		1	2	2	3		1
	10(0/10)	20(8/12)	2(0/2)	½		1	1		½
		4(2/2)	2(1/1)	2					2

а)

б)

Рисунок. 6.1 Розподіл комбінацій генотипів у пацієнтів з ВМД («суха»/«волога») – а) та у групі порівняння – б)

В групі порівняння було визначено 15 варіантів комбінацій, серед яких найчастіше зустрічались 3: G/G-T/T-G/G, G/G-T/T-G/A та G/G-T/C-G/A. У хворих з ВМД було виявлено 22 варіанти комбінації генів, з яких найчастішими були 7: G/G-T/C-G/A, G/G-C/C-G/A, G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/G, G/A-C/C-G/A, G/A-T/T-G/A і G/A-T/C-G/G. Серед них комбінації генотипів G/G-T/T-G/A, G/G-T/C-G/A, G/A-T/T-G/A, G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/A, найчастіше зустрічались у «сухій» формі захворювання, а варіанти G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/G, G/A-C/C-G/G і G/A-C/C-G/A – у «вологій».

В таблиці 6.1. представлені результати статистичного аналізу асоціації комбінацій генотипів зазначених поліморфізмі з ризиком розвитку ВМД.

Таблиця 6.1 Асоціація комбінацій генотипів ОНП rs1061170, rs11200638 та rs1800629 з ризиком розвитку ВМД

Комбінація генотипів (TNF-CFH-HTRA1)	χ^2 ВМД χ^2 Суха/Волога	ВШ ВМД ВШ Суха/Волога	ДІ ВМД ДІ Суха/Волога
G/G-T/T-G/G	16,73 (p< 0,001) 10,8/8,86 (p =0,002/0,002)	0,18 0,14/ 0,053	0,076 – 0,423 0,042-0,483/ 0,021-0.137
G/G-T/T-G/A	5,96 (p=0,015) 1.127/7.36 (p = 0,289 / 0,007)	0,384 0,06/0,016	0,174-0,846 0.028-0,120 / 0,005-0,053
G/A-T/T-G/G	18,89 (p<0,001)	0,15 0,104/0.195	0,06-0,39 0,024-0,46 /

	10,94/8,42 (p<0,001/0,004)		0,064-0,595
G/G-T/C-G/A	15.7 (p<0,001) 14.08/8,76 (p< 0,001/ p=0,004)	7,14 9,32/5,37	2,48-20.56 3,09-28,11/ 1,74-16.58
G/G-C/C-G/A	0,26 (p = 0,61) 0,05/0,23 (p = 0,8/0,64)	1,73 1,6/1,85	0,458-6,531 0,35-7,38/0,43- 7,95
G/A-T/T-G/A	5.18 p =0.02 7,89/1,43 (p =0,005/0,23)	(5,52) 8.03/3.40	(1.25-24.27) 1.75-36.91/0,67- 17.24
G/A-T/C-G/A	15,7 (p<0,001) 19,08/8,76 (p<0,001/ p =0,004)	7,14 9.32/5,37	2,48-20.56 3.09-28,11/1,74- 16.58
G/A-C/C-G/G	2.5 p =0.12 0,007/6,89 (p = 0,934/0,002)	5,91 -/11,95	0,75-46,82 -/1,5-95,24
G/A-C/C-G/A	8,22 (p = 0,005) 5,33/9.10 (p = 0.02/0.003)	12.53 10,27/14.68	1.66-94.77 1.26-83,8/1,87- 115,21

Статистично значущий зв'язок із «сухою» формою ВМД був виявлений для 4 комбінацій генотипів, G/A-C/C-G/A ($p = 0.02$), G/A-T/C-G/A ($p < 0,001$), G/A-T/T-G/A ($p = 0,005$), G/A-T/C-G/A ($p < 0,001$). З ризиком розвитку «вологої» форми ВМД була виявлена асоціація з 4 комбінаціями генотипів: G/A-C/C-G/A ($p = 0,003$), G/A-C/C-G/G ($p = 0,002$), G/G-T/C-G/A ($p = 0,004$), G/A-T/C-G/A ($p = 0,004$).

Для носіїв трьох комбінацій генотипів було виявлено значний протективний вплив щодо ризику розвитку обох форм ВМД, зокрема: G/A-T/T-G/G (ВШ = 0,15, 95% ДІ: 0,06-0,39, $p < 0,001$), G/G-T/T-G/G (ВШ = 0,18, 95% ДІ: 0,076 – 0,423, $p < 0,001$) та G/G-T/T-G/A (ВШ = 0,384, 95% ДІ: 0,174-0,846, $p = 0,015$). Причому носійство двох останніх комбінацій мало найбільший протективний вплив щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД – ВШ = 0,016 (95% ДІ: 0,005-0,053, $p = 0,007$) та ВШ = 0,053 (95% ДІ: 0,021-0,137, $p = 0,002$), відповідно.

Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «сухої» форми ВМД мали комбінації генотипів G/A-C/C-G/A (ВШ = 10.27, 95% ДІ: 1.26-83,8; $p = 0.02$; (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0), G/A-T/C-G/A (ВШ = 9,32, 95% ДІ: 3.09-28,11, $p < 0,001$; AUC=0,905 (ДІ=0,794-1,0) та G/A-T/T-G/A (ВШ = 8,03, 95% ДІ: 1.75-36.91, $p = 0,005$; AUC=0,881(ДІ=0,712-1,0).

Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «вологої» форми ВМД мала комбінація генотипів G/A-C/C-G/A (ВШ = 12.53, 95% ДІ: 1.66-94.77; $p = 0,005$ (AUC=0,96; ДІ=0,91-0,99).

При аналізі характеру ROC-кривих при «сухій» формі ВМД було виявлено статистично значущий зв'язок між 5 комбінаціями генотипів і розвитком «сухої» форми ВМД ($p < 0,05$) (див. рис. 6.2).

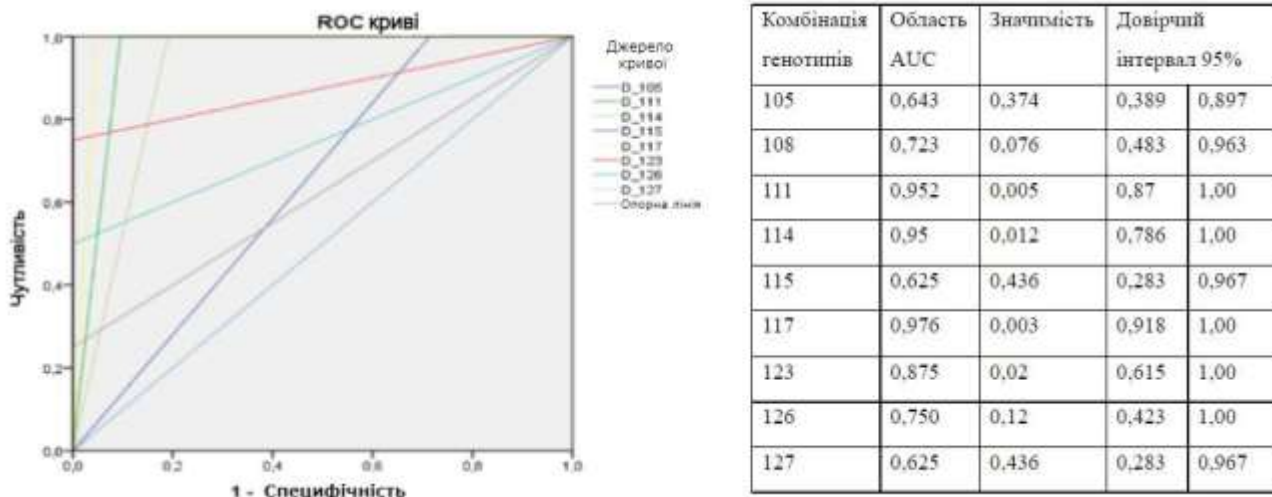
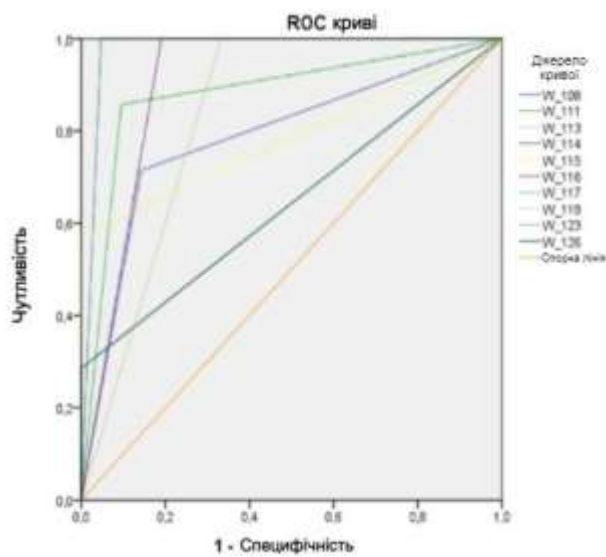


Рисунок 6.2 - Характеристика ROC-кривої та значення AUC у пацієнтів з сухою формою ВМД залежно від сполучення поліморфних варіантів.

У результаті дослідження було виявлено, що комбінації генотипів G/A-T/T-G/A (AUC=0,881; ДІ=0,712-1,0), G/A-T/C-G/A (AUC=0,905; ДІ=0,794-1,0), G/A-C/C-G/A (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0) і A/A-T/C-G/A (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0) мали статистично значущі значення області AUC, що підтверджує наявність зв'язку між ризиком розвитку «сухої» форми ВМД і досліджуваними сполученнями поліморфних варіантів, а низькі показники довірчого інтервалу (ДІ) свідчать про високу точність отриманих результатів площі під кривою. Окрім того, характер ROC-кривих при цих сполученнях поліморфних варіантів та високі значення AUC (AUC>0,8) свідчать про адекватність розрахованої логістичної моделі та високоякісну передбачувальну здатність досліджуваного діагностичного тесту, що дозволяє використовувати комбінації генотипів G/A-T/T-G/A, G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/A і A/A-T/C-G/A як генетичних маркерів ризику виникнення «сухої» форми ВМД.

В той самий час, при аналізі характеру ROC-кривих при «вологій» формі ВМД було виявлено достовірний зв'язок між 6 комбінаціями генотипів і розвитком цієї форми патології ($p < 0,05$) (див. рис. 6.2).



Комбінація генотипів	Область AUC	Значимість	Довірчий інтервал 95%	
108	0,786	0,026	0,568	1,00
111	0,881	0,003	0,712	1,00
113	0,833	0,009	0,687	0,98
114	0,905	0,002	0,794	1,00
115	0,625	0,436	0,283	1,00
116	0,976	0,000	0,920	1,00
117	0,976	0,000	0,920	1,00
118	0,643	0,265	0,377	0,908
123	0,643	0,265	0,377	0,908
126	0,643	0,265	0,377	0,908
127	0,643	0,265	0,377	0,908

Рисунок 6.3 - Характеристика ROC-кривої та значення AUC у пацієнтів з сухою формою ВМД залежно від сполучення поліморфних варіантів.

Як видно з результатів аналізу (див. рис. 6.3), комбінації генотипів G/G-C/C-G/A (AUC=0,786; ДІ=0,568-1,0) G/A-T/T-G/A (AUC=0,881; ДІ=0,712-1,0), G/A-T/C-G/G (AUC=0,833; ДІ=0,687-0,98), G/A-T/C-G/A (AUC=0,905; ДІ=0,794-1,0), G/A-C/C-G/G (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0) і G/A-C/C-G/A (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0) мали статистично значущі показники області AUC ($p < 0,05$), яка відрізнялася від 0,5 (при значенні AUC=0,5 безкорисного класифікатора), що вказує на значущий вплив перерахованих вище варіантів на виникнення «вологої» форми ВМД. Характер ROC-кривих при комбінаціях G/A-T/T-G/A, G/A-T/C-G/G, G /A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/G, G/A-C/C-G/A (крива прилягає до верхнього лівого кута рисунку) та високі значення області AUC (AUC>0,8) вказують на адекватність розрахованої логістичної моделі та високоякісну

передбачувальну здатність при їх виявленні в пацієнтів. Водночас варіант G/G-C/C-G/A мав хорошу передбачувальну здатність розрахованої логістичної моделі, що також дозволяє використовувати його як генетичного маркера розвитку ВМД, але високі значення довірчого інтервалу (ДІ=0,568-1,0), у порівнянні з іншими значущими комбінаціями генотипів, вказують на нижчу чутливість розрахованої області AUC.

Окрім цього, при оцінці прогностичної значущості сполучень поліморфних варіантів було виявлено 3 комбінації генотипів, а саме варіанти G/A-T/T-G/A, G/A-T/C-G/A і G/A-C/C-G/A, які мали достовірний сильний вплив на виникнення як «сухої», так і «вологої» форми ВМД ($p < 0,01$), що підтверджується високими статистично значущими показниками області AUC ($AUC > 0,9$) при обох формах ВМД (див. рис. 6.1-6.2) та характером ROC-кривих, що вказує на їх вірогідний вплив як на виникнення, так і на прогресування патології.

Варіанти G/G-T/C-G/A, G/A-C/C-A/A, A/A-C/C-G/A і A/A-C/C-A/A не мали вірогідного статистичного зв'язку з виникненням ВМД, що пов'язано з малою кількістю вибірки з даними комбінаціями генотипів і потребує проведення когортних досліджень для включення їх як факторів ризику розвитку ВМД.

Показники специфічності та чутливості комбінацій поліморфних варіантів використаних поліморфізмів в якості прогностичних маркерів ризику розвитку ВМД представлені в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2 - Чутливість і специфічність визначення комбінацій поліморфізмів rs1800629 (гена *TNF*), rs1061170 (гена *CFH*), rs11200638 (гена *HTRA1*) щодо ризику розвитку ВМД

Генотип (TNF-CFH-HTRA1)	Чутливість ВМД Чутливість Суха/Волога	Специфічність ВМД Специфічність Суха/Волога
G/G-C/C-G/A	52,9% 57,1%/50%	87,5% 87,5%/87,5%
G/A-T/T-G/A	69,2% 80%/54,5%	91,3% 91,3%/91,3%
G/A-T/C-G/G	57,9% 50%/61,5%	75% 75%/75%
G/A-T/C-G/A	83,7% 88,9%/77,3%	84% 84%/84%
G/A-T/C-A/A	38,5% 25%/44,4%	95,5% 100%/100%
G/A-C/C-G/G	55,6% -/66,7%	95,5% -/95,5%
G/A-C/C-G/A	71,4% 72,7%/70,6%	95,5% 95,5%/95,5%
A/A-T/C-G/A	38,5% 50%/28,6%	100% 100%/100%

Резюме

Таким чином, в ході роботи вперше в українській популяції були виявлені комбінації генотипів поліморфізмів rs1800629 гена TNF – rs1061170 гена CFH – rs11200638 гена HTRA1, асоційовані з розвитком ВМД.

Аналіз ROC-кривих вказує на високу ефективність визначення вищевказаних комбінацій генотипів для діагностики обох форм ВМД ($p < 0,05$), а при оцінці показників чутливості й специфічності було встановлено, що найкращими показниками чутливості та специфічності при «сухій» формі ВМД володіли комбінації G/A-T/T-G/A (Ч=80 %; С=91,3 %), G/A-T/C-G/A (Ч=88,9 %; С=84 %) і G/A-C/C-G/A (Ч=72,7 %; С=95,5 %), а при «вологій» – G/A-T/C-G/A (Ч=83,7 %; С=84 %) і G/A-C/C-G/A (Ч=70,6 %; С=95,5 %), що дозволяє використовувати їх як діагностичний маркер ВМД.

Даний розділ висвітлений у матеріалах наступних публікацій здобувача:

[155]

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Вікова дегенерація жовтої плями є найпоширенішою причиною незворотної втрати зору у людей серед людей похилого віку (старше 65 років). За статистичними даними 2020 року встановлено, що близько 200 мільйонів людей страждають від цього захворювання у всьому світі, а невилікувана ВМД є причиною 9% усіх випадків сліпоти [1].

За даними Європейського Консорціуму Епідеміології Очних Хвороб у європейській популяції спостерігається тенденція до подальшого зростання поширеності патології. Так, шляхом математичного моделювання вченим вдалося з'ясувати приблизні темпи поширення ВМД і припустити, що до 2040 року кількість людей у Європі з ранньою ВМД налічуватиме від 14,9 до 21,5 мільйонів осіб, а з пізньою ВМД – від 3,9 до 4,8 мільйона [2]. За даними аналізу World Report on Vision від ВООЗ, датованого 2019 роком, проблема поширення патології стає все більш актуальною – серед 2,2 мільярда людей, що мають погіршення зору різного генезу, ВМД займає 3-тє місце в структурі захворюваності та налічує близько 196 мільйонів осіб, що страждають на різні її форми [3]. Сильний вплив демографічної тенденції на поширеність ВМД можна побачити у зростанні частоти захворювання у 24 % осіб віком 65-74 років та понад 44 % в осіб 70-95 років [4, 5].

Окрім вираженої залежності захворювання від вікової складової на розвиток дегенеративних змін у структурах макулярної області (хоріокапілярів, мембрани Бруха, ПЕС) також впливають ряд метаболічних, функціональних, генетичних та екологічних факторів, які, взаємодіючи між собою, різним ступенем діють на регуляцію численних стимуляторів та інгібіторів ангиогенезу, сприяючи тим самим появі та розвитку клінічної картини ВМД [6].

Сучасні дані свідчать, що на розвиток дисбалансу у системі ангиогенезу впливає ряд генетичних факторів, які беруть участь у регуляції імунної відповіді та розвитку місцевого запалення у сітківці, що створює клітинне та молекулярне середовище, сприятливе для поширення проангіогенних чинників або навпаки, розвитку атрофії певних ділянок макули [7, 8]. Для детального вивчення цих обабічних впливів було проведено дослідження САТТ (Comparison of AMD Treatments Trials), що пролило світло на раніше невідомі асоціації генетичних тригерів з початком та перебігом патології, а також ефективності лікування [9]. Зокрема, було виявлено зв'язок між ВМД та поліморфізмом гена *CFH* rs1061170, який відповідає за регуляцію системи комплементу – однієї з головних ланок імунної відповіді [10-12]. Окрім того, ряд досліджень алельних асоціацій щороку вказують на зв'язок ВМД з ОНП rs11200638 гена *HTRA1* та rs1800629 гена *TNF*, який кодує медіатор запальної відповіді першого порядку – фактору некрозу пухлин (TNF) [13-15]. Численні патофізіологічні механізми виникнення обох форм ВМД, переплетені між цими трьома поліморфізмами, та публікації по вивченню впливу цих ОНП серед різних популяцій світу зумовило вибір поліморфізмів генів *CFH* (rs1061170), *HTRA1* (rs11200638) та *TNF* (rs1800629) як генів-кандидатів для нашого дослідження.

Враховуючи патологоанатомічні особливості захворювання, класично виділяють дві підгрупи ВМД: атрофічну («суха» форма) і ексудативну («волога» форма, що поділяється на два типи, в залежності від особливостей неоваскуляризації). «Суха» форма (також відома як географічна атрофія, як центральна, так і/або нецентральна) зазвичай характеризується прогресивним перебігом, що призводить до дегенерації ПЕС та фоторецепторів [16]. За результатами наших досліджень було виявлено статистично значуще переважання частоти мінорної алелі С (0,44) ОНП rs1061170 гена *CFH* серед

пацієнтів з «сухою» формою ВМД, ніж у групі порівняння (0,25). Окрім того, було виявлено статистично значуще переважання гетерозиготних (ТС) і гомозиготних СС носіїв мінорного алеля серед пацієнтів з атрофічною ВМД, у порівнянні з контрольною групою порівняння, де ці показники склали 0,371 та 0,067 відповідно (див. табл.4.3 та 4.4.). При цьому, гомозиготний стан за мажорним алелем мав протективну роль у виникненні «сухої» форми ВМД (ВШ = 0,26). Подібних результатів у своїх дослідженнях досягли Simonett J. et al. і Maugeri A. et al., що додатково вказує на достовірність отриманих нами результатів [10, 17].

Незважаючи на те, що понад 80 % усіх людей із проміжною та пізньою ВМД мають «суху» форму, при дії певних факторів вона може прогресувати у «вологу», що призводить до значно більшої втрати зору [16]. Екссудативна форма пов'язана з хоріоїдальною неоваскуляризацією, викликаною дерегуляцією факторів росту. У здорових осіб ендотеліальні клітини, що вистилають кровоносні судини, стійкі до неоваскулярних подразників, а в судинах сітківки відбувається повільна проліферація ендотеліальних клітин [1]. Такі клітини є відносно «тихими» через баланс між проангіогенними (наприклад, фактор росту ендотелію судин (VEGF)) та антиангіогенними (наприклад, фактор, що походить від пігментного епітелію (PEDF)) чинниками – PEDF запобігав раннім мітогенним сигналам VEGF-A в ендотеліальних клітинах, блокуючи проліферацію, міграцію та утворення трубок шляхом інгібування фосфорилування та активації п'яти основних сигнальних паттернів VEGF-A [18]. Однак, при функціональній гіперактивності проангіогенної сигналізації (наприклад, VEGF > PEDF) починається ріст нових судин, які характеризуються своєю слабкістю та ламкістю, таким чином часто являючись каталізаторами кровотеч, які й стають причиною різкого погіршення центрального зору [19]. Зважаючи на те, що Wang S. et al. у своєму дослідженні

виявив імунні механізми трансформації «сухої» ВМД у її «вологу» форму, нами додатково був проведений аналіз впливу поліморфізму rs1061170 гена *CFH* на розвиток неоваскуляризації в сітківці [20]. За результатами аналізу була виявлена статистично значуща різниця у розподілі генотипів між пацієнтами з «вологою» ВМД та групою порівняння ($p < 0,01$). Було виявлена статистично значуща асоціація як носійства мінорної алелі С (ВШ = 2,31) так і генотипів ТС (ВШ = 1,98) і СС (ВШ = 2,84) щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД. Таким чином, можна припустити вплив ОНП rs1061170 гена *CFH* як на виникнення, так і на прогресування захворювання. Останнє може підтверджуватися результатами робіт Liu J. і Hoh J., які виявили, що дисрегуляція у роботі *CFH* призводить до підвищеної міграції ендотеліальних клітин, тим самим сприяючи ангіогенезу у зоні запалення, що може служити за механізм трансформації «сухої» форми ВМД у «вологу» і потребує подальших досліджень [21]. Окрім того, Khanani A. et al. виявили, що міграція імунокомпетентних клітин у зону запалення супроводжується підвищенням концентрації ангіопоетину і VEGF, які рахуються одними з основних факторів ангіогенезу, чим також можна пояснити процеси неоваскуляризації в сітківці при наявності мінорної алелі С гена *CFH* у пацієнта [22]. За результатами аналізу нами вперше в українській популяції була виявлена асоціація ОНП rs1061170 гена *CFH* з розвитком обох форм ВМД.

Також за допомогою аналізу ROC-кривих та показників чутливості й специфічності було встановлено, що виявлення гетерозиготного генотипу дозволяє з чутливістю 64,9% виставити діагноз «сухої» ВМД, а «вологої» – з 67,2 %, при, тому що специфічність незалежно від форми захворювання складала 60,2 %. При генотипі АА показники чутливості склали 36,6 % та 63,0 % для «сухої» та «вологої» ВМД відповідно, а специфічності – 89,4 % для обох форм патології, що свідчить про ефективність використання rs1061170 гена

CFH як маркера діагностики ВМД.

Аналізуючи можливі патогенетичні механізми впливу поліморфізму rs1061170 гена CFH на виникнення обох форм ВМД варто розглянути його функціональне значення. Ген CFH (також відомий як AC3b1NA, адренomedулін-зв'язуючий білок-1, фактор Н АМ-зв'язуючого білку-1, β 1H-глобулін, прискорювач інактиватора C3b, Н-фактор або Н-фактор-1) є важливим членом регуляторів системи комплементу [23]. CFH належить до надродини структурно та функціонально споріднених білків, які називаються регуляторами активації комплементу Н (Regulators of Complement Activation), що кодуються кластером генів у хромосомі 1q31 та містить 23 екзони і охоплює більше ніж 94 кб геномної ДНК [24-27]. Його кодуюча ділянка знаходиться у локусі 1q31.3, на довгому плечі хромосоми 1 – експресований протеїн складається з 1231 амінокислот, що об'єднані у 20 повторюваних патернів (коротких консенсусних повторів – short consensus repeats, SCRs) по 60 амінокислот, та має молекулярну масу 139096 Да [26-30]. Цей ген був першим із зареєстрованих варіабельних ділянок у цьому кластері [31, 32]. CFH зазвичай виступає як базовий репресор вродженої імунної системи, що гальмує шлях переходу C3 у C3b в каскаді перетворень системи комплементу [33, 34]. Системний дефіцит CFH сприяє надмірній та патогенній активації альтернативного шляху комплементу, пов'язаного з підвищеною його активністю стосовно здорових клітин господаря, аутоімунними реакціями, вторинною альтерацією тканин та стійкою або хронічною запальною відповіддю на неспецифічні подразники [35]. Протизапальний ефект CFH у великій мірі залежить від статусу пов'язаного з геном-експресором поліморфізму rs1061170, також відомого в міжнародній номенклатурі як Tyr402His, Y402H або 1277 T→C, і розташованого у функціональному домені

гена [31, 36, 37]. Ділянка білку, що знаходиться під впливом цього поліморфізму, являє собою короткий консенсусний повтор 7 (SCR7) і призводить до неправильного функціонування білка CFH, виступає пріоритетним місцем зв'язування з гепарином, глікозаміногліканами, М-білком стрептококку та С-реактивним білком [10, 11, 29, 36], тому генетичні варіації у даному сайті зв'язування демонструють знижену здатність приєднувати останній і, таким чином, унеможливають достатнє гальмування ефекторних ланок комплексу [38, 39].

Відомо, що компоненти каскаду комплексу ідентифікуються у пацієнтів, хворих на ВМД: відкладення локалізувались у мембрані Бруха, міжкапілярних стовпах та у друзах [40-42]. Це призвело до формулювання гіпотези, що ВМД є результатом аберантного запального процесу внаслідок невідповідної активації комплексу [41], проте, результати клінічних досліджень виявились суперечливими. Наприклад, Fukuda Y. et al. у своїй роботі серед 327 пацієнтів виявив підвищену схильність до утворення парадруз та розвитку ВМД у пацієнтів з мутантною алеллю гена CFH, тоді як у друзах спостерігалась висока концентрація білків системи комплексу та самого CFH [43], у той час, як Klein R. et al. виявили протективний вплив мутантної алелі на виникнення пізньої ВМД [41].

Пізніше було показано, що сила зв'язку між поліморфізмом rs1061170 і ВМД знижується у дослідженнях із Заходу на Схід. Наприклад, Maugeri A. et al. виявили, що у європейській популяції ризик захворювання збільшувався у 2,04 раза при наявності поліморфізму, тоді як більшість індивідуальних досліджень, що були проведені в азійській популяції повідомляли про відсутність асоціації з корейцями, японцями та китайцями, що певною мірою пояснюється низькою частотою мінорних алелей в азійській популяції [10].

Таким чином, отримані в нашому дослідженні статистично значущі

результати щодо впливу rs1061170 гена CFH на ризик виникнення обох форм ВМД відповідають даним, отриманим іншими дослідниками, та дозволяють стверджувати про статистично значущий зв'язок цього ОНП із виникненням захворювання. Однак, мультифакторіальність ВМД та наявність різноманітних патофізіологічних механізмів, залучених до її розвитку є причиною низьких показників чутливості при виявленні лише одного поліморфізму CFH, що викликає потребу у дослідженні інших генів та їх асоціацій з виникненням захворювання для підвищення діагностичної цінності ПЛР діагностики.

Альтернативною точкою прикладання у патогенезі ВМД виявився продукт гена *HTRA1*, який було вперше ідентифіковано у фібробластах людини як чутливий до трансформації білок, а назву присвоєно внаслідок надзвичайної схожості з сімейством HtrA серинової протеази *Escherichia coli*, яка має важливе значення для існування бактерій в умовах високих температур [44, 45]. Ефекти HTRA1 цим не обмежуються – він виступає універсальним тригером реакції на стрес, в тому числі окислювальний; на інфекційний агент, підвищену фагову активність та синтез аберантних білків всередині бактеріальної клітини [46]. За даними Suranji S. et al., дисрегуляція оксидантної та антиоксидантної систем, що також виникає при поліморфізмі rs11200638, сприяє прискореному старінню клітин RPE через шлях p38, тим самим викликаючи атрофічні та дегенеративні зміни у ділянці макули, що слугує початком для виникнення «сухої» форми ВМД [47]. При цьому, завдяки своєму впливу на імунокомпетентні клітини, які здатні продукувати проангіогенні фактори, включаючи VEGF, вважається, що HTRA1 також залучений до прогресування захворювання із виникненням «волової» форми ВМД [48, 49].

На опосередкований вплив досліджуваного ОНП на розвиток ВМД вказують дані щодо статистично значущої різниці у розподілі генотипів та алелей rs11200638 серед пацієнтів з атрофічною/неоваскулярною ВМД та

групою порівняння ($p < 0,001$). В наших дослідженнях було встановлено, що гетерозиготний варіант (GA) зустрічався з високою частотою як серед хворих із «сухою» (0,82), так і з «вологою» (0,56) формою ВМД, тоді як у групі порівняння цей показник був в 2,1 разів меншим, ніж серед пацієнтів з «сухою» формою ВМД (0,40). Схожа ситуація склалась і стосовно носіїв генотипу AA – серед пацієнтів з «сухою» формою захворювання цей генотип зустрічався в 7,36, а серед пацієнтів з «вологою» - в 11,9 разів частіше, ніж в контрольній групі порівняння. Отримані результати щодо розподілу генотипів в популяції мешканців Поділля подібні до результатів, отриманих в інших дослідженнях. Зокрема, Matuskova V. et al. та Mohamad N. et al., у роботах яких також було виявлено більшу поширеність генотипів AA та GA серед пацієнтів з ВМД, коли гомозиготи за мажорним варіантом цього ОНП переважали у групі порівняння [24, 50].

Підсумовуючи, слід зазначити, що носійство мінорної алелі A підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2,88 разів (OR=2,88; 95 % ДІ 1.84 – 4.49), а «вологої» – в 2.43 рази (OR=2,43; 95% ДІ 1.57 – 3.77) ($p < 0,001$). Носійство генотипу GA збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 6,84 разів (OR=6,84; 95 % ДІ 3.51 – 13.34), а «вологої» – у 1.88 рази (OR=1.88; 95 % ДІ 1.08 – 3.30) ($p < 0,01$). Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) підвищує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.39 рази (OR=2.39; 95 % ДІ 0.21 – 26.82) ($p < 0,001$), «вологої» форми ВМД у 13.30 рази (OR=13.30; 95 % ДІ 1.68–105.10) ($p < 0,001$). Крім цього, аналіз ROC-кривих та показників чутливості й специфічності дозволив встановити, що виявлення гетерозиготного генотипу дозволяє з чутливістю 83,9% та специфічністю 59,6 % виставити діагноз «сухої» форми захворювання, а «вологої» – 62,8 і 59,2 % відповідно. При генотипі AA показники чутливості склали 12,5 та 25,6 % для «сухої» та «вологої» ВМД відповідно, а специфічності – 98,4 % незалежно від форми

патології, що свідчить про задовільну ефективність використання rs11200638 гена *HTRA1* як маркера діагностики ВМД.

Високий асоціативний зв'язок, виявлений у дослідженні, у першу чергу пояснюється функціональним значенням гена *HTRA1* та його поліморфізмом rs11200638. *HTRA1* (ген, що кодує HtrA серинову пептидазу 1) розташований на довгому плечі 10-ї хромосоми, у локусі 10q26.13 і містить 9 кодуючих ділянок [24, 37, 51-53]. Продукт мРНК, синтезований на матриці гена *HTRA1*, має довжину 2138 азотистих основ та відкриту рамку зчитування довжиною 1443 пар нуклеотидів. Кінцевим продуктом гена є поліпептид молекулярною масою 50 кДа, що формується із 480 амінокислотних залишків і є представником серинових протеаз сімейства трипсину [53].

Виходячи з попередніх досліджень у модельних організмах, таких як миша (*Mus musculus domesticus*) та шпоркова жаба (*Xenopus*), було визначено що HtrA1 відіграє регуляторну роль у передачі сигналів TGF- β та FGF. Внаслідок цього *HTRA1* широко експресується майже в усіх тканинах людини [54]. Наприклад, висока експресія характерна для секреторного епітелію молочної залози, клітин протоків печінки, каналців кори нирок і залозистого епітелію проліферуючого ендометрію. Найвища експресія виявлена у зрілих шарах епідермісу. Аномальну експресію гену пов'язують з рядом захворювань, включаючи артрит та численні види раку [51, 55].

Наукова спільнота припускає, що *HTRA1* сприяє деградації позаклітинних протеїназ, зокрема декорину та сімейство білків Gla, які залучені у патогенез ВМД, а також регулює ангиогенез шляхом трансформації фактора диференціації росту 6 (growth differentiation factor 6, GDF6), який пригнічує сигналізацію, опосередковану членами родини TGF- β . До того, протеомічні дослідження виявили ще більше білків, що взаємодіють з *HTRA1*, і запропонували потенційний зв'язок з регуляцією шляху комплементу шляхом

розщеплення кластерину, вітронектину та фібромодуліну [56]. Це вірогідно призводить до пошкодження мембрани Бруха, підвищеної васкуляризації позаклітинного матриксу епітелію сітківки, зменшення компенсаторного ресурсу у відповідь на клітинний стрес [57, 58]. Таким чином, HTRA1 здатний зв'язувати та деградувати компоненти екстрацелюлярного матриксу, брати участь у неоваскуляризації та потовщенні мембрани Бруха з віком [6, 59-61].

Поліморфізм rs11200638 -625 G>A у промоторній ділянці гена HTRA1 довжиною 512 пар основ, розташований приблизно на 7 кб нижче LOC387715/ARMS2 [37, 50, 52, 62]. Дана мутація по типу вставки/делеції, локалізованої між bp -3,836 та -3,783, у ряді досліджень демонструвала активність регулятора транскрипції цільового гена, унікальну для послідовності вставки/делеції в цілому [58, 63]. Детальний аналіз цих відомостей показав, що варіант вставки/делеції перериває супресорний цис-елемент і замінює його активатором, що істотно змінює HTRA1 транскрипцію у клітинах фоторецепторів. Це дає змогу встановити, що активність регуляторних елементів HTRA1 модулюється розгалуженою системою факторів транскрипції та епігенетичних впливів [60]. Цікавою особливістю є автономна регуляція експресії HTRA1, що не залежить від АТФ і значною мірою не залежить від інших кофакторів, таких як рН середовища, активні відновники та двовалентні катіони [64].

Стосовно алельних варіацій вірогідно відомо, що алель ризику А для rs11200638 асоціюється з підвищеним рівнем експресії його мРНК та білка, що, своєю чергою, підсилює біологічні ефекти протеїну [65], зокрема: гомозигота за алелем ризику А міцно асоційована з підвищенням ризику вікової макулярної дегенерації в середньому у 10 разів; гетерозигота зберігає патогенну здатність у 2 рази більше, ніж гомозигота за алелем G [53, 66, 67]. Тобто генотип АА

значно підсилює транскрипційні впливи гена HTRA1 у порівнянні з генотипом GG [56].

Повногеномні дослідження виділяли біля 30 потенційних локусів, що здатні впливати на перебіг ВМД тим чи іншим чином, та, враховуючи дані з різних популяцій, стабільно міцний зв'язок поліморфізму із дегенерацією макули проявляв саме rs11200638, незалежно від географії досліджень. Пул включав: чеську, китайську, східну кавказьку, французьку, італійську, фінську, індійську етнічну групу, при цьому вищевказані закономірності зберігалися у переважної більшості досліджуваних [44, 48, 50, 63, 68]. Ця інформація знаходить і патоморфологічне підтвердження – значна експресія білка HtrA спостерігалася у друзах, що є одним з головних проявів патології, а також пігментному епітелії сітківки та неоваскулярних утворень хоріоїдеї в осіб із ВМД [14].

Таким чином, отриманий в нашому дослідженні статистично значущий сильний асоціативний зв'язок між rs11200638 гена HTRA1 та обома формами ВМД, дає можливість стверджувати про наявність впливу досліджуваного поліморфізму на виникнення та прогресування ВМД, що дозволяє використовувати його як діагностичний маркер захворювання. Однак, низькі показники чутливості при визначенні цього поліморфізму знижують діагностичну цінність його виявлення, що потребує подальших досліджень для пошуку пов'язаних патогенетично та патофізіологічно генів з HTRA1 з метою покращення якості та доцільності ПЛР дослідження при діагностиці ВМД.

Як вже було сказано, кумулятивні окисні стимули, пов'язані з віком і опосередковані через активні форми кисню (reactive oxygen species, ROS) та азоту (reactive nitrogen species, RNS), викликають дегенерацію клітин пігментного епітелію та неповний лізис зовнішніх сегментів фоторецепторів, що призводить до акумуляції клітинних відходів, які, своєю чергою,

провокують апоптоз [69].

Цитокиновий фактор некрозу пухлини (tumor necrosis factor α , TNF- α) – один із головних регуляторів імунної системи, що здатен впливати на апоптоз, проліферацію та диференціацію клітин, локальне й системне запалення, імунну відповідь через його сайт зв'язування – TNF-рецептор 1 типу (TNFR1). Відомо, що TNFR1 може викликати окислювальний стрес безпосередньо шляхом активації ферментів, що продукують ROS і RNS, залучаючи фундаментальні сигнальні шляхи NFE2L2, PGC-1, p62, AMPK й PI3K / Akt / mTOR [70]. Його поліморфізм rs1800629 викликає заміну гуаніну (G) на аденін (A), що призводить до збільшення транскрипційної активності TNF- α у 2-3 рази [71, 72]. Зважаючи на здатність TNF- α викликати перебудову клітинного матриксу, зокрема, мембрани Бруха, а також внаслідок його впливу на окисний стрес та розвиток апоптозу, ми висунули припущення про роль поліморфізму rs1800629 у виникненні ВМД.

Підсумовуючи результати дослідження асоціації ОНП rs1800629 гена TNF із розвитком обох форм ВМД встановлено, що носійство мінорної алелі А підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2.39 рази (OR=2.39 ; 95 % ДІ 1.75 – 4.29), а «вологої» – в 2.74 рази (OR= 2.74; 95 % ДІ 1.75 – 4.29) ($p<0,001$). Носійство гетерозиготного варіанту поліморфізму (GA) підвищує ризик виникнення «сухої» форми ВМД у 2.68 рази (OR=2.68 ; 95 % ДІ 1.49 – 4.81), а неоваскулярної форми – у 4.05 рази (OR= 4.05; 95 % ДІ 2.25 – 7.28) ($p<0,001$). Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) збільшує шанс виникнення «сухої» форми патології у 2.90 рази (OR= 2.90; 95 % ДІ 0.73 – 11.58), а «вологої» – у 2.24 рази (OR=2.24; 95 % ДІ 0.54 – 9.22) ($p<0,05$).

Для розуміння виявленого асоціативного зв'язку необхідно детальніше розглянути функцію TNF у контексті ВМД. Первинні ефекти TNF пов'язані з цитоплазматичним доменом TNFR1, що послідовно рекрутує домени смерті, які

пов'язані з рецептором TNF- α , такі як TRADD (tumor necrosis factor receptor type 1-associated via death domain protein), Fas (Fas associated death domain, FADD) та каспаза-8 (також відому як FADD-подібний до ICE, Fas-associated death domain-like IL-1 β -converting enzyme, або FLICE), тим самим сприяючи дегенерації численних білків у сітківці [73].

Разом з тим, внаслідок взаємодії з антиапоптичним рецептором DCR1 (decoy receptor 1, також відомий як TRAIL receptor 3 (TRAILR3)) TNF- α реалізує свій вплив на сигнальні шляхи регуляції апоптозу та неоваскуляризації, проліферації та диференціації, імунного розпізнавання та запальної відповіді. Наприклад, зв'язуючись з антиапоптотичним рецептором DCR1 TNF- α попереджує дегенерацію клітин у сітківці, проте, через зниження рівнів самого рецептора у пацієнтів з обома формами ВМД, що також може бути опосередковано TNF- α , апоптичні процеси в макулі розвиваються у надмірних масштабах, викликаючи «атрофічну» форму ВМД [74].

У той самий час, результати досліджень припускають, що секреція VEGF в умовах запалення залежить від клітинної поляризації, а TNF- α -індуковане пригнічення VEGF може призвести до атрофії хоріоїдеї в поляризованих фізіологічних клітинах пігментного епітелію сітківки, коли TNF- α -індукована висхідна регуляція VEGF може викликати неоваскуляризацію, що вважається одним із компонентів пізньої ВМД [75]. Це підтверджується фактами успішного застосування біологічних агентів таргетованої дії до VEGF та TNF- α у контексті сповільнення прогресування ВМД [76].

Ще одним вірогідним патофізіологічним механізмом виникнення ВМД при поліморфізмі rs1800629 гена TNF є регуляція оксидативного стресу в організмі. Вважається, що TNF- α залучений у регуляції сімейства антиоксидантних систем, які захищають клітину від оксидативного стресу, запускаючи не тільки низхідні впливи, але й отримуючи зворотний зв'язок

щодо власної експресії [77]. Так, він активно взаємодіє через клітинні та молекулярні маркери запалення та окисного стресу (наприклад, IL-1 β , TGF- β , ABCG1, ABCA1, відновлений глутатіон), і майже кожен з них змінює метаболізм ROS у клітинах пігментного епітелію сітківки, обмежуючи оксидативний стрес за фізіологічного функціонування. Додатковим доказом асоціації між TNF та ROS є здатність інгібіторів каспаз та жиророзчинних акцепторів вільних радикалів (наприклад, токоферолу) послаблювати цитотоксичність, індуковану ВМД, зокрема при лікуванні блокаторами TNF [78].

Разом з тим, можливість TNFR1, який взаємодіє з TNF- α , викликати окислювальний стрес безпосередньо шляхом активації продукції ROS і RNS, які володіють потужними прозапальними та проапоптичними ефектами, а також виявлена Kim Y. et al. роль вільних форм кисню та азоту у розвитку неоваскуляризації, сильно перекликається з вищенаведеними відомостями про шляхи впливу rs1800629 гена TNF на виникнення ВМД, що дозволяє додатково підтвердити його зв'язок із цим захворюванням [79].

Таким чином, отриманий у нашому дослідженні статистично значущий міцний асоціативний зв'язок між rs1800629 гена TNF та обома формами ВМД, говорить про наявність впливу даного поліморфізму на виникнення та прогресування ВМД в українській популяції, що дозволяє використовувати його як діагностичний маркер захворювання.

Незважаючи на те, що отримані результати щодо впливу кожного з генів-кандидатів свідчили про сильну асоціацію між їх мінорними поліморфними варіантами та розвитком ВМД, проблематичним залишалось питання низької діагностичної цінності при визначенні ОНП одного гена. Розв'язанням цієї проблеми було дослідження впливу асоціацій поліморфізмів rs1800629 гена TNF, rs1061170 гена CFH і rs11200638 гена HTRA1. Це пов'язано з тим, що

аналіз асоціацій на рівні сполучень алельних варіантів може виявитись більш потужним та інформативним інструментом, ніж дослідження окремих маркерів. Наприклад, Lorés-Motta L. et al. виявили, що гаплотипи CFH у локусі CFH-CFHR5, зокрема асоціації поліморфізмів CFH (rs570618, rs10922109 і rs6181892) та окремі низькочастотні варіанти CFHR2 (p.Cys72Tyr) і CFHR5 (p.Cys208Arg) пов'язані з більшою сприйнятливістю до розвитку ВМД, ніж кожен поліморфізм окремо, внаслідок їх спільного інгібіторного впливу на систему білків FHR-2 і FHR-5 [80]. Водночас, Pappas C. et al. встановили, що асоціації окремих поліморфізмів CFHR5 та rs800292 гена CFH мають протективний вплив на виникнення ВМД, навіть при одночасній наявності мутантних алелів асоціації ARMS2/HTRA1 [81].

Таким чином, якщо окремі гени-кандидати мають певне значення щодо схильності до мультифакторіального захворювання, то у взаємодії з іншими генетичними діагностичними маркерами їх асоціація з ВМД може як посилюватись, так і послаблюватись, навіть, змінюючи свій вектор дії з фактора ризику на протективний. Тому останнім етапом у нашій роботі стало дослідження асоціації комбінацій генотипів поліморфізмів rs1800629 гена TNF, rs1061170 гена CFH і rs11200638 гена HTRA1. Ми встановили, що комбінації генотипів G/G-T/T-G/A, G/G-T/C-G/A, G/A-T/T-G/A, G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/A найчастіше зустрічались при «сухій» формі захворювання, а варіанти G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/G, G/A-C/C-G/G і G/A-C/C-G/A – при «вологій», що вказує на їх вплив у виникненні цих форм ВМД. Разом з тим, серед контрольної групи найчастіше зустрічались 3 комбінації, а саме G/G-T/T-G/G, G/G-T/T-G/A та G/G-T/C-G/A, що імовірно свідчить про їх протективну роль у виникненні ВМД.

Статистичний аналіз дозволив виявити комбінації генотипів поліморфізмів rs1800629 гена TNF – rs1061170 гена CFH – rs11200638 гена

HTRA1, асоційовані з розвитком ВМД. Було встановлено, що комбінації генотипів G/G-T/T-G/A, G/G-T/C-G/A, G/A-T/T-G/A, G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/A найчастіше зустрічались при «сухій» формі захворювання, а варіанти G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/G, G/A-C/C-G/G і G/A-C/C-G/A. Разом з тим, в групі порівняння найчастіше зустрічались 3 комбінації, а саме G/G-T/T-G/G, G/G-T/T-G/A та G/G-T/C-G/A.

Статистично значущий зв'язок із «сухою» формою ВМД був виявлений для 4 комбінацій генотипів, G/A-C/C-G/A ($p = 0.02$), G/A-T/C-G/A ($p < 0,001$), G/A-T/T-G/A ($p = 0,005$), G/A-T/C-G/A ($p < 0,001$). З ризиком розвитку «вологої» форми ВМД була виявлена асоціація з 4 комбінаціями генотипів: G/A-C/C-G/A ($p = 0,003$), G/A-C/C-G/G ($p = 0,002$), G/G-T/C-G/A ($p = 0,004$), G/A-T/C-G/A ($p = 0,004$). Для носіїв трьох комбінацій генотипів було виявлено значний протективний вплив щодо ризику розвитку обох форм ВМД, зокрема: G/A-T/T-G/G (ВШ = 0,15, 95% ДІ: 0,06-0,39, $p < 0,001$), G/G-T/T-G/G (ВШ = 0,18, 95% ДІ: 0,076 – 0,423, $p < 0,001$) та G/G-T/T-G/A (ВШ = 0,384, 95% ДІ: 0,174-0,846, $p = 0,015$). Причому носійство двох останніх комбінацій мало найбільший протективний вплив щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД – ВШ = 0,016 (95% ДІ: 0,005-0,053, $p = 0,007$) та ВШ = 0,053 (95% ДІ: 0,021-0,137, $p = 0,002$), відповідно.

Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «сухої» форми ВМД мали комбінації генотипів G/A-C/C-G/A (ВШ = 10.27, 95% ДІ: 1.26-83,8; $p = 0.02$; (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0), G/A-T/C-G/A (ВШ = 9,32, 95% ДІ: 3.09-28,11, $p < 0,001$; AUC=0,905 (ДІ=0,794-1,0) та G/A-T/T-G/A (ВШ = 8,03, 95% ДІ: 1.75-36.91, $p = 0,005$; AUC=0,881(ДІ=0,712-1,0). Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «вологої» форми ВМД мала комбінація генотипів G/A-C/C-G/A (ВШ = 12.53, 95% ДІ: 1.66-94.77; $p = 0,005$ (AUC=0,96; ДІ=0,91-0,99).

ВИСНОВКИ

Дисертаційне дослідження було присвячене вирішенню актуального завдання сучасної медицини – підвищення ефективності, діагностики та прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації, шляхом визначення ролі факторів ризику та генетичного поліморфізму генів-кандидатів (rs1800629 гена TNF, rs1061170 гена CFH і rs11200638 гена HTRA1) у її виникненні та прогресуванні у мешканців Подільського регіону України.

1. Виявлено асоціацію ОНП *rs11200638* гена *HTRA1* з розвитком ВМД. Носійство мінорної алелі *A* підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2,88 разів (OR=2,88; 95 % ДІ 1.84 – 4.49), а «вологої» – в 2.43 рази (OR=2,43; 95% ДІ 1.57 – 3.77) ($p<0,001$). Носійство генотипу *GA* збільшує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 6,84 разів (OR=6,84; 95 % ДІ 3.51 – 13.34), а «вологої» – у 1.88 рази (OR=1.88; 95 % ДІ 1.08 – 3.30) ($p<0,01$). Гомозиготне носійство мінорної алелі (*AA*) підвищує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.39 рази (OR=2.39; 95 % ДІ 0.21 – 26.82) ($p<0,001$), «вологої» форми ВМД у 13.30 рази (OR=13.30; 95 % ДІ 1.68– 105.10) ($p<0,001$).

2. Показано асоціацію ОНП *rs1061170* гена *CFH* з розвитком ВМД. Носійство мінорної алелі *C* підвищує шанси виникнення «сухої» форми захворювання у 2,31 рази (OR=2,31; 95 % ДІ 1,5-3,55), а «вологої» – у 3,96 рази (OR=3,96; 95 % ДІ 2,59-6,04) ($p<0,001$). Носійство гетерозиготного генотипу (*TC*) підвищує ризик розвитку «сухої» форми ВМД у 1.98 рази (OR=1.98; 95 % ДІ 1.12–3.52), а «вологої» – у 1.35 рази (OR=1.35; 95 % ДІ 0.77 – 2.37) ($p<0,001$). Водночас генотип *CC* збільшує шанс виникнення «сухої» форми ВМД у 2.84 рази (OR= 2.84; 95 % ДІ 1.10 – 7.31), а «вологої» – у 7.56 рази (OR=7.56; 95 %

ДІ 3.16 – 18.09) ($p < 0,001$).

3. Встановлено асоціацію ОНП *rs1800629* гена *TNF* з розвитком ВМД. Носійство мінорної алелі А підвищує шанс виникнення «сухої» форми захворювання у 2.39 рази (OR=2.39 ; 95 % ДІ 1.75 – 4.29), а «вологої» – в 2.74 рази (OR= 2.74; 95 % ДІ 1.75 – 4.29) ($p < 0,001$). Носійство гетерозиготного варіанту поліморфізму (GA) підвищує ризик виникнення «сухої» форми ВМД у 2.68 рази (OR=2.68 ; 95 % ДІ 1.49 – 4.81), а неоваскулярної форми – у 4.05 рази (OR= 4.05; 95 % ДІ 2.25 – 7.28) ($p < 0,001$). Гомозиготне носійство мінорної алелі (AA) збільшує шанс виникнення «сухої» форми патології у 2.90 рази (OR= 2.90; 95 % ДІ 0.73 – 11.58), а «вологої» – у 2.24 рази (OR=2.24; 95 % ДІ 0.54 – 9.22) ($p < 0,05$).

4. З'ясовано асоціацію комбінацій генотипів поліморфізмів *rs1800629* гена *TNF* – *rs1061170* гена *CFH* – *rs11200638* гена *HTRA1* з розвитком ВМД. Статистично значущий зв'язок із «сухою» формою ВМД був виявлений для 5 комбінацій генотипів, серед яких найбільшу прогностичну значущість мали: G/A-C/C-G/A (ВШ = 10.27, 95% ДІ: 1.26-83,8; $p = 0.02$; (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0), G/A-T/C-G/A (ВШ = 9,32, 95% ДІ: 3.09-28,11, $p < 0,001$; AUC=0,905 (ДІ=0,794-1,0) та G/A-T/T-G/A (ВШ = 8,03, 95%ДІ: 1.75-36.91, $p = 0,005$; AUC=0,881(ДІ=0,712-1,0). З ризиком розвитку «вологої» форми ВМД була виявлена асоціація з 4 комбінаціями генотипів, найбільш значущими з яких були G/A-C/C-G/A (ВШ = 14.68, 95% ДІ: 1,87-115,21; $p = 0,003$; (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0) і G/A-C/C-G/G (ВШ = 11.95, 95% ДІ: 1,50-95,24; $p = 0,002$; (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0). Також 4 типи комбінацій генотипів були асоційовані з ризиком розвитку захворювання для загальної групи пацієнтів з ВМД, з яких високу прогностичну значущість мала G/A-C/C-G/A (ВШ = 12.53, 95% ДІ: 1.66-94.77; $p = 0,005$ (AUC=0,96; ДІ=0,91-0,99).

5. Вперше серед мешканців Подільського регіону України було виявлено комбінації генотипів (TNF rs1800629 – CFH rs1061170 – HTRA1 rs11200638), Для носіїв трьох комбінацій генотипів було виявлено значний протективний вплив щодо ризику розвитку обох форм ВМД, зокрема: G/A-T/T-G/G (ВШ = 0,15, 95% ДІ: 0,06-0,39, $p < 0,001$), G/G-T/T-G/G (ВШ = 0,18, 95% ДІ: 0,076 – 0,423, $p < 0,001$) та G/G-T/T-G/A (ВШ = 0,384, 95% ДІ: 0,174-0,846, $p = 0,015$). Причому носійство двох останніх комбінацій мало найбільший протективний вплив щодо ризику розвитку «вологої» форми ВМД – ВШ = 0,016 (95% ДІ: 0,005-0,053, $p = 0,007$) та ВШ = 0,053 (95% ДІ: 0,021-0,137, $p = 0,002$), відповідно.

Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «сухої» форми ВМД мали комбінації генотипів G/A-C/C-G/A (ВШ = 10,27, 95% ДІ: 1,26-83,8; $p = 0,02$; (AUC=0,976; ДІ=0,92-1,0), G/A-T/C-G/A (ВШ = 9,32, 95% ДІ: 3,09-28,11, $p < 0,001$; AUC=0,905 (ДІ=0,794-1,0) та G/A-T/T-G/A (ВШ = 8,03, 95%ДІ: 1,75-36,91, $p = 0,005$; AUC=0,881(ДІ=0,712-1,0).

Найбільшу прогностичну значущість щодо ризику «вологої» форми ВМД мала комбінація генотипів G/A-C/C-G/A (ВШ = 12,53, 95% ДІ: 1,66-94,77; $p = 0,005$ (AUC=0,96; ДІ=0,91-0,99).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Особам старше 40 років рекомендовано проводити скринінг у вигляді молекулярно-генетичного обстеження однонуклеотидних поліморфізмів rs1800629 TNF, rs1061170 CFH, rs11200638 HTRA1 з метою виявлення схильності до виникнення та розвитку вікової макулярної дегенерації.

До групи ризику слід включати осіб із комбінаціями генотипів G/A-T/T-G/A, G/A-T/C-G/A, G/A-C/C-G/A щодо розвитку обох форм ВМД. Пацієнти з комбінаціями генотипів G/A-T/C-G/A та G/A-C/C-G/A є групою ризику щодо розвитку «вологої» форми захворювання.

Пацієнтам із груп ризику рекомендовано ретельно слідкувати за будь-якими змінами стану здоров'я, звертатись за комплексною консультацією до офтальмолога щорічно, модифікувати свій спосіб життя та регулювати прояви інших факторів ризику.

При наявності мінорної алелі А ОНП rs11200638 гена HTRA1 (незалежно від алельного статусу) за результатами генотипування, особам слід застосовувати профілактичні заходи та посилено піклуватись про власне здоров'я, оскільки при даному генетичному варіанті високий ризик виникнення «сухої» форми ВМД.

У разі гомозиготного носійства мінорних алелів АА ОНП rs11200638 гена HTRA1 (ВШ = 13,3), СС ОНП rs1061170 гена CFH (ВШ = 7,56) та АА ОНП rs1800629 гена TNF (ВШ = 2,24) варто завчасно застосовувати профілактичні та лікувальні заходи так як у цих пацієнтів вникає швидка хоріоїдальна неоваскуляризація, що лежить в основі виникнення «вологої» форми ВМД.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Stahl, A. (2020). The Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Dtsch Arztebl Int*, 117(29-30), 513-520. doi: 10.3238/arztebl.2020.0513.
2. Colijn, J. M., Buitendijk, G. H. S., Prokofyeva, E., Alves, D., Cachulo, M. L., Khawaja, A. P., Cougnard-Gregoire, A., Merle, B. M. J., Korb, C., Erke, M. G., Bron, A., Anastasopoulos, E., Meester-Smoor, M. A., Segato, T., Piermarocchi, S., de Jong, P. T. V. M., Vingerling, J. R., Topouzis, F., Creuzot-Garcher, C., Klaver, C. C. W. (2017). Prevalence of age-related macular degeneration in Europe. *Ophthalmology*, 124(12), 1753-1763. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.05.035.
3. World Health Organization. (2019). *World report on vision*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516570>
4. Korb, C. A., Kottler, U. B., Wolfram, C., Hoehn, R., Schulz, A., Zwiener, I., Wild, P. S., Pfeiffer, N., & Mirshahi, A. (2014). Prevalence of age-related macular degeneration in a large European cohort: results from the population-based Gutenberg Health Study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 252(9), 1403-1411. doi: 10.1007/s00417-014-2591-9.
5. Brandl, C., Zimmermann, M. E., Günther, F., Barth, T., Olden, M., Schelter, S. C., Kronenberg, F., Loss, J., Küchenhoff, H., Helbig, H., Weber, B. H. F., Stark, K. J., & Heid, I. M. (2018). On the impact of different approaches to classify age-related macular degeneration: Results from the German AugUR study. *Sci Rep*, 8(8675), 1-10. doi: 10.1038/s41598-018-26629-5.
6. Heesterbeek, T. J., Lorés-Motta, L., Hoyng, C. B., Lechanteur, Y. T. E., & den Hollander, A. I. (2020). Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt*, 40(2), 140-170. doi:

- 10.1111/opo.12675.
7. Gorin, M. B., & daSilva, M. J. (2020). Predictive genetics for AMD: Hype and hopes for genetics-based strategies for treatment and prevention. *Exp Eye Res*, *191*(107894), 1-8. doi: 10.1016/j.exer.2019.107894.
 8. Gu, J., Qiu, Z., Li, L., Qin, B., Zhou, Y., Liu, Y., Liu, X., Zhu, M., & Sang, A. (2021). Geniposide alleviates choroidal neovascularization by downregulating HB-EGF release from RPE cells by downregulating the miR-145-5p/NF- κ B axis. *Exp Eye Res*, *208*(108624), 1-10. doi: 10.1016/j.exer.2021.108624.
 9. Miller, J. W. (2020). Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials 2: Introducing Comparative Effectiveness Research. *Ophthalmology*, *127*(4), S133-S134. doi: 10.1016/j.optha.2019.11.025.
 10. Maugeri, A., Barchitta, M., & Agodi, A. (2019). The association between complement factor H rs1061170 polymorphism and age-related macular degeneration: a comprehensive meta-analysis stratified by stage of disease and ethnicity. *Acta Ophthalmol*, *97*(1), e8-e21. doi: 10.1111/aos.13849.
 11. Wu, M., Guo, Y., Ma, Y., Zheng, Z., Wang, Q., & Zhou, X. (2016). Association of Two Polymorphisms, rs1061170 and rs1410996, in Complement Factor H with Age-Related Macular Degeneration in an Asian Population: A Meta-Analysis. *Ophthalmic Res*, *55*(3), 135-144. doi: 10.1159/000442257.
 12. Kubicka-Trzaska, A., Żuber-Łaskawiec, K., Dziedzina, S., Sanak, M., Romanowska-Dixon, B., & Karska-Basta, I. (2022). Genetic Variants of Complement Factor H Y402H (rs1061170), C2 R102G (rs2230199), and C3 E318D (rs9332739) and Response to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Medicina (Kaunas)*, *58*(5), 1-16. doi: 10.3390/medicina58050658.
 13. Liu, Y., Jin, H., Wei, D., & Li, W. (2020). HTRA1 rs11200638 variant and AMD risk from a comprehensive analysis about 15,316 subjects. *BMC Med*

Genet, 21(1), 107. doi: 10.1186/s12881-020-01047-5.

14. Zhou, Y., Chen, C., Wang, Y., Tong, Y., Fang, X., Li, L., & Wang, Z. (2017). Association between polymorphism rs11200638 in the HTRA1 gene and the response to anti-VEGF treatment of exudative AMD: a meta-analysis. *BMC Ophthalmology*, 17(97), 1-9. doi: 10.1186/s12886-017-0487-2.

15. Zazeckyte, G., Gedvilaite, G., Vilkeviciute, A., Kriauciuniene, L., Balciuniene, V. J., Mockute, R., & Liutkeviciene, R. (2022). Associations of Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Polymorphisms (TNF)- α TNF-863A/C (rs1800630), TNF-308A/G (rs1800629), TNF-238A/G (rs361525), and TNF-Alpha Serum Concentration with Age-Related Macular Degeneration. *Life (Basel)*, 12(7), 1-12. doi: 10.3390/life12070928.

16. Ferris, F. L., Wilkinson, C. P., Bird, A., Chakravarthy, U, Chew, E, Csaky, K, Sadda, S. R., & Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. (2013). Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 120(4), 844-851. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.10.036.

17. Simonett, J. M., Sohrab, M. A., Pacheco, J., Armstrong, L. L., Rzhetskaya, M., Smith, M., Hayes, M. G., & Fawzi, A. A. (2015). A Validated Phenotyping Algorithm for Genetic Association Studies in Age-related Macular Degeneration. *Sci Rep*, 5(12875), 1-8. doi: 10.1038/srep12875.

18. Xi, L. (2020). Pigment Epithelium-Derived Factor as a Possible Treatment Agent for Choroidal Neovascularization. *Oxid Med Cell Longev*, 2020(8941057), 1-11. doi: 10.1155/2020/8941057.

19. Li, R., Du, J., Yao, G., Yao, Y., & Zhang, J. (2019). Autophagy: a new mechanism for regulating VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium cells. *Int J Ophthalmol*, 12(4), 557-562. doi: 10.18240/ijo.2019.04.05.

20. Wang, S., Wang, X., Cheng, Y., Ouyang, W., Sang, X., Liu, J., Su, Y., Liu, Y., Li, C., Yang, L., Jin, L., & Wang, Z. (2019). Autophagy Dysfunction, Cellular Senescence, and Abnormal Immune-Inflammatory Responses in AMD:

From Mechanisms to Therapeutic Potential. *Oxid Med Cell Longev*, 2019(3632169), 1-13. doi: 10.1155/2019/3632169.

21. Liu, J., & Hoh, J. (2017). Loss of Complement Factor H in Plasma Increases Endothelial Cell Migration. *J Cancer*, 8(12), 2184-2190. doi: 10.7150/jca.19452.

22. Khanani, A. M., Russell, M. W., Aziz, A. A., Danzig, C. J., Weng, C. Y., Eichenbaum, D. A., & Singh, R. P. (2021). Angiopoietins as Potential Targets in Management of Retinal Disease. *Clin Ophthalmol*, 2021(15), 3747-3755. doi: 10.2147/OPHTH.S231801.

23. Lukiw, W. J., & Alexandrov, P. N. (2012). Regulation of Complement Factor H (CFH) by Multiple miRNAs in Alzheimer's Disease (AD) Brain. *Mol Neurobiol*, 46(1), 11-19. doi: 10.1007/s12035-012-8234-4.

24. Matušková, V., Zeman, T., Ewerlingová, L., Hlinomazová, Z., Souček, J., Vlková, E., Goswami, N., Balcar, V. J., & Šerý, O. (2020). An association of neovascular age-related macular degeneration with polymorphisms of CFH, ARMS2, HTRA1 and C3 genes in Czech population. *Acta Ophthalmologica*, 98(6), e691-e699. doi: 10.1111/aos.14357.

25. Liao, X., Lan, C., Cheuk, I., & Tan, Q. (2016). Four complement factor H gene polymorphisms in association with AMD: A meta-analysis. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 64, 123-129. doi: 10.1016/j.archger.2016.01.011.

26. Narayanan, R., Butani, V., Boyer, D. S., Atilano, S. R., Resende, G. P., Kim, D. S., Chakrabarti, S., Kuppermann, B. D., Khatibi, N., Chwa, M., Nesburn, A. B., & Kenney, M. C. (2007). Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 114(7), 1327-1331. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.10.035.

27. GeneCards – the human gene database. CFH Gene – GeneCards. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFH>. Accessed: June 28, 2005.

28. Boon, C. J. F., van de Kar, N. C., Klevering, B. J., Keunen, J. E. E., Cremers, F. P. M., Klaver, C. C. W., Hoyng, C. B., Daha, M. R., & den Hollander, A. I. (2009). The spectrum of phenotypes caused by variants in the CFH gene. *Molecular Immunology*, *46*(8-9), 1573-1594. doi: 10.1016/j.molimm.2009.02.013.
29. Cho, H. Y., Park, H. S., Ko, E. J., Ryu, C. S., Kim, J. O., Kim, Y. R., Ahn, E. H., Lee, W. S., & Kim, N. K. (2020). Association of Complement Factor D and H Polymorphisms with Recurrent Pregnancy Loss. *Int J Mol Sci*, *21*(17), 1-10. doi: 10.3390/ijms21010017.
30. Zhang, D., Wang, D., Li, Y., & Yao, Y. (2014). Mapping genetic variants in the CFH gene for association with leprosy in Han Chinese. *Genes & Immunity*, *15*, 506-510.
31. Babanejad, M., Moein, H., Akbari, M. R., Badiei, A., Yaseri, M., Soheilian, M., & Najmabadi, H. (2016). Investigating the CFH Gene Polymorphisms as a Risk Factor for Age-related Macular Degeneration in an Iranian Population. *Ophthalmic Genet*, *37*(2), 144-149. doi: 10.3109/13816810.2014.955585.
32. Capoluongo, E., Concolino, P., Piccardi, M., Marangoni, D., Mello, E., Minnella, A. M., Savastano, C., Fadda, A., Zuppi, C., Bisti, S., & Falsini, B. (2012). Retinal function and CFH-ARMS2 polymorphisms analysis: a pilot study in Italian AMD patients. *Neurobiol Aging*, *33*(8), 1852.e5-1852.e12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.03.008.
33. Cantsilieris, S., Nelson, B. J., Huddleston, J., Baker, C., Harshman, L., Penewit, K., Munson, K. M., Sorensen, M., Welch, A. E., Dang, V., Grassmann, F., Richardson, A. J., Guymer, R. H., Graves-Lindsay, T. A., Wilson, R. K., Weber, B. H. F., Baird, P. N., Allikmets, R., & Eichler, E. E. (2018). Recurrent structural variation, clustered sites of selection, and disease risk for the complement factor H (CFH) gene family. *PNAS*, *115*(19), E4433-E4442. doi: 10.1073/pnas.1717600115.
34. Ezzeldin, N., El-Lebedy, D., Darwish, A., El-Bastawissy, A., & Shalaby,

A. E. (2015). Complement factor H polymorphism rs1061170 and the effect of cigarette smoking on the risk of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, 19(6), 441-445. doi: 10.5114/wo.2015.56202.

35. Kanemitsu, S., & Hara, T. (2000). [Factor H deficiency]. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*, 32, 218-220.

36. Despriet, D. D. G., Klaver, C. C. W., Witteman, J. C. M., Bergen, A. A. B., Kardys, I., de Maat, M. P. M., Boekhoorn, S. S., Vingerling, J. R., Hofman, A., Oostra, B. A., Uitterlinden, A. G., Stijnen, T., van Duijn, C. M., & de Jong, P. T. V. M. (2006). Complement Factor H Polymorphism, Complement Activators, and Risk of Age-Related Macular Degeneration. *JAMA*, 296(3), 301-309. doi:10.1001/jama.296.3.301.

37. Nakanishi, H., Gotoh, N., Yamada, R., Yamashiro, K., Otani, A., Hayashi, H., Tsujikawa, A., Shimada, N., Ohno-Matsui, K., Mochizuki, M., Saito, M., Saito, K., Iida, T., Matsuda, F., & Yoshimura, N. (2010). ARMS2/HTRA1 and CFH polymorphisms are not associated with choroidal neovascularization in highly myopic eyes of the elderly Japanese population. *Eye*, 24, 1078-1084.

38. Jylhävä, J., Eklund, C., Jylhä, M., Hervonen, A., Lehtimäki, T., Karhunen, P., & Hurme, M. (2009). Complement factor H 402His variant confers an increased mortality risk in Finnish nonagenarians: the Vitality 90+ study. *Exp Gerontol*, 44(4), 297-299. doi: 10.1016/j.exger.2008.10.006.

39. Giannakis, E., Jokiranta, T. S., Male, D. A., Ranganathan, S., Ormsby, R. J., Fischetti, V. A., Mold, C., & Gordon, D. L. (2003). A common site within factor H SCR 7 responsible for binding heparin, C-reactive protein and streptococcal M protein. *European Journal of Immunology*, 33(4), 962-969. doi: 10.1002/eji.200323541.

40. Díaz-Villamarín, X., Blánquez-Martínez, D., Pozo-Agundo, A., Pérez-Gutiérrez, A. M., Muñoz-Ávila, J. I., Antúnez-Rodríguez, A., Fernández-Gómez, A. E., García-Navas, P., Martínez-González, L. J., & Dávila-Fajardo, C. L. (2020).

Genetic Variants Affecting Anti-VEGF Drug Response in Polypoidal Choroidal Vasculopathy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Genes (Basel)*, *11*(1335), 1-13. doi: 10.3390/genes11111335.

41. Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J., Sackler, R. S., Haynes, C., Henning, A. K., SanGiovanni, J. P., Mane, S. M., Mayne, S. T., Bracken, M. B., Ferris, F. L., Ott, J., Barnstable, C., & Hoh, J. (2005). Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science*, *308*(5720), 385-389. doi: 10.1126/science.1109557.

42. Lin, J., Tsai, Y., Wan, L., Lin, H., Tsai, Y., Lee, C., Tsai, C., Tsai, F., & Tseng, S. (2008). Complement Factor H Variant Increases The Risk For Early Age-related Macular Degeneration. *Retina*, *28*(10), 1416-1420. doi: 10.1097/IAE.0b013e318184661d.

43. Fukuda, Y., Sakurada, Y., Yoneyama, S., Kikushima, W., Sugiyama, A., Matsubara, M., Tanabe, N., & Iijima, H. (2019). Clinical and genetic characteristics of pachydrusen in patients with exudative age-related macular degeneration. *Sci Rep*, *9*(11906), 1-7. doi: 10.1038/s41598-019-48494-6.

44. Wang, G. (2014). Chromosome 10q26 locus and age-related macular degeneration: A progress update. *Experimental Eye Research*, *119*, 1-7. doi: 10.1016/j.exer.2013.11.009.

45. Chien, J., & Shridhar, V. (2013). Chapter 571 - HtrA1 Peptidase. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, *3*, 2577-2584. doi: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00571-8.

46. Hu, S., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D., & Crowl, R. M. (1998). Human HtrA, an Evolutionarily Conserved Serine Protease Identified as a Differentially Expressed Gene Product in Osteoarthritic Cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(51), 34406-34412. doi: 10.1074/jbc.273.51.34406.

47. Supanji, Shimomachi, M., Hasan, Z., Kawaichi, M., & Oka, C. (2013). HtrA1 is induced by oxidative stress and enhances cell senescence through p38 MAPK pathway. *Exp Eye Res*, *112*, 79-92. doi: 10.1016/j.exer.2013.04.013.
48. Kumaramanickavel, G. (2016). Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, *5*(4), 229-235. doi: 10.1097/APO.0000000000000223.
49. Chen, C., Melo, E., Jakob, P., Friedlein, A., Elsässer, B., Goettig, P., Kueppers, V., Delobel, F., Stucki, C., Dunkley, T., Fauser, S., Schilling, O., & Iacone, R. (2018). N-Terminomics identifies HtrA1 cleavage of thrombospondin-1 with generation of a proangiogenic fragment in the polarized retinal pigment epithelial cell model of age-related macular degeneration. *Matrix Biol*, *70*, 84-101. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.013.
50. Mohamad, N. A., Ramachandran, V., Isa, H. M., Chan, Y. M., Ngah, N. F., Ching, S. M., Hoo, F. K., Wan Sulaiman, W. A., Inche Mat, L. N., & Mohamed, M. H. (2019). Association of HTRA1 and ARMS2 gene polymorphisms with response to intravitreal ranibizumab among neovascular age-related macular degenerative subjects. *Hum Genomics*, *13*(13), 1-12. doi: 10.1186/s40246-019-0197-3.
51. Li, Y., Yuan, J., Rothzerg, E., Wu, X., Xu, H., Zhu, S., & Xu, J. (2020). Molecular structure and the role of high-temperature requirement protein 1 in skeletal disorders and cancers. *Cell Prolif*, *53*(2), 1-9. doi: 10.1111/cpr.12746.
52. Yang, Z., Camp, N. J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D. J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., Chien, J., Dewan, A., Harmon, J., Bernstein, P. S., Shridhar, V., Zabriskie, N. A., Hoh, J., Howes, K., & Zhang, K. (2006). A Variant of the HTRA1 Gene Increases Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration. *Science*, *314*(5801), 992-993. doi: 10.1126/science.1133811.
53. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. HTRA1 – HtrA serine peptidase 1. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5654>. Accessed: August 5, 2022.

54. De Luca, A., De Falco, M., Severino, A., Campioni, M., Santini, D., Baldi, F., Paggi, M. G., & Baldi, A. (2003). Distribution of the serine protease HtrA1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, *51*(10), 1279-1284. doi: 10.1177/002215540305101004.

55. Tossetta, G., Fantone, S., Licini, C., Marzioni, D., & Mattioli-Belmonte, M. (2022). The multifaced role of HtrA1 in the development of joint and skeletal disorders. *Bone*, *157*(116350), 1-10. doi: 10.1016/j.bone.2022.116350.

56. Stanton, C. M., Chalmers, K. J., & Wright, A. F. (2011). The Chromosome 10q26 Susceptibility Locus in Age-Related Macular Degeneration. *Retinal Degenerative Diseases*, *723*, 365-370 doi: 10.1007/978-1-4614-0631-0_47.

57. The AMD Gene Consortium. (2013). Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics*, *45*(4), 433-439. doi: 10.1038/ng.2578.

58. Askari, M., Nikpoor, A. R., Gorjipour, F., Mazidi, M., Sanati, M. H., Aryan, H., Irani, A., Falavarjani, K. G., Nazari, H., & Mousavizadeh, K. (2015). Association of Htra1 gene polymorphisms with the risk of developing AMD in Iranian population. *Rep Biochem Mol Biol*, *4*(1), 43-49.

59. UniProt. HTRA1 – Serine protease HTRA1. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q92743/entry>. Accessed: August 3, 2022.

60. Iejima, D., Itabashi, T., Kawamura, Y., Noda, T., Yuasa, S., Fukuda, K., Oka, C., & Iwata, T. (2015). HTRA1 (High Temperature Requirement A Serine Peptidase 1) Gene Is Transcriptionally Regulated by Insertion/Deletion Nucleotides Located at the 3' End of the ARMS2 (Age-related Maculopathy Susceptibility 2) Gene in Patients with Age-related Macular Degeneration. *Molecular Bases of Disease*, *290*(5), 2784-2797. doi: 10.1074/jbc.M114.593384.

61. Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiha-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., Matsumoto, M., &

Kawaichi, M. (2004). HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*, *131*(5), 1041-1053. doi: 10.1242/dev.00999.

62. Francis, P. J., Zhang, H., DeWan, A., Hoh, J., & Klein, M. L. (2008). Joint effects of polymorphisms in the HTRA1, LOC387715/ARMS2, and CFH genes on AMD in a Caucasian population. *Mol Vis*, *14*, 1395-1400.

63. Liutkeviciene, R., Vilkeviciute, A., Gedvilaite, G., Kaikaryte, K., & Kriauciuniene, L. (2019). Haplotypes of HTRA1 rs1120638, TIMP3 rs9621532, VEGFA rs833068, CFI rs10033900, ERCC6 rs3793784, and KCTD10 rs56209061 Gene Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. *Dis Markers*, *2019*(9602949), 1-11. doi: 10.1155/2019/9602949.

64. Fasano, A., Formichi, P., Taglia, I., Bianchi, S., Di Donato, I., Battisti, C., Federico, A., & Dotti, M. T. (2020). HTRA1 expression profile and activity on TGF- β signaling in HTRA1 mutation carriers. *J Cell Physiol*, *235*(10), 7120-7127. doi: 10.1002/jcp.29609.

65. Horie-Inoue, K., & Inoue, S. (2014). Genomic aspects of age-related macular degeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, *452*(2), 263-275. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.013.

66. SNPedia. rs11200638 – SNPedia. Available from: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs11200638>. Accessed: January 4, 2021.

67. Tong, Y., Liao, J., Zhang, Y., Zhou, J., Zhang, H., & Mao, M. (2010). LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Mol Vis*, *16*, 1958-1981.

68. Mori, K., Gehlbach, P. L., Kabasawa, S., Kawasaki, I., Oosaki, M., Iizuka, H., Katayama, S., Awata, T., & Yoneya, S. (2007). Coding and Noncoding Variants in the CFH Gene and Cigarette Smoking Influence the Risk of Age-Related Macular Degeneration in a Japanese Population. *Retinal Cell Biology*, *48*(11), 5315-5319. doi: 10.1167/iovs.07-0426.

69. Zhang, Z., Bao, X., Cong, Y., Fan, B., & Li, G. (2020). Autophagy in

Age-Related Macular Degeneration: A Regulatory Mechanism of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2020(2896036), 1-13. doi: 10.1155/2020/2896036.

70. Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*, 50(3), 184-95. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.

71. Shi, L., Zhang, L., Zhang, D., Zhou, J., Jiang, X., Jin, Y., & Chang, W. (2021). Association between TNF- α G-308A (rs1800629) polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Periodontal Res*, 56(2), 226-235. doi: 10.1111/jre.12820.

72. Zhang, Y., Cao, Y., Xin, L., Gao, N., & Liu, B. (2018). Association between rs1800629 polymorphism in tumor necrosis factor- α gene and dilated cardiomyopathy susceptibility. *Medicine (Baltimore)*, 97(50), e13386. doi: 10.1097/MD.00000000000013386.

73. Sethi, G., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*, 13, 5094-5107. doi: 10.2741/3066.

74. Anand, A., Sharma, N. K., Singh, R., Gupta, A., Prabhakar, S., Jindal, N., Bhatt, A. K., Sharma, S. K., & Gupta, P. K. (2014). Does DcR1 (TNF-related apoptosis-inducing-ligand Receptor 3) have any role in human AMD pathogenesis? *Scientific Reports*, 4(4114), 1-5. doi: 10.1038/srep04114.

75. Terasaki, H., Kase, S., Shirasawa, M., Otsuka, H., Hisatomi, T., Sonoda, S., Ishida, S., Ishibashi, T., & Sakamoto, T. (2013). TNF- α decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF- κ B pathways. *PLoS One*, 8(7), e69994. doi: 10.1371/journal.pone.0069994.

76. Wang, X., Ma, W., Han, S., Meng, Z., Zhao, L., Yin, Y., Wang, Y., & Li, J. (2017). TGF- β participates choroid neovascularization through Smad2/3-VEGF/TNF- α signaling in mice with Laser-induced wet age-related macular degeneration. *Sci Rep*, 7(9672), 1-13. doi: 10.1038/s41598-017-10124-4.

77. Promsote, W., Veeranan-Karmegam, R., Ananth, S., Shen, D., Chan, C., Lambert, N. A., Ganapathy, V., & Martin, P. M. (2014). L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid attenuates oxidative stress and inflammation in retinal pigment epithelium. *Mol Vis*, *20*, 73-88.
78. Lu, J., Miyakawa, K., Roth, R. A., & Ganey, P. E. (2013). Tumor necrosis factor-alpha potentiates the cytotoxicity of amiodarone in Hepa1c1c7 cells: roles of caspase activation and oxidative stress. *Toxicol Sci*, *131*(1), 164-178. doi: 10.1093/toxsci/kfs289.
79. Kim, Y., Kim, S., Tatsunami, R., Yamamura, H., Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2017). ROS-induced ROS release orchestrated by Nox4, Nox2, and mitochondria in VEGF signaling and angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, *312*(6), C749-C764. doi: 10.1152/ajpcell.00346.2016.
80. Lorés-Motta, L., van Beek, A. E., Willems, E., Zandstra, J., van Mierlo, G., Einhaus, A., Mary, J., Stucki, C., Bakker, B., Hoyng, C. B., Fauser, S., Clark, S. J., de Jonge, M. I., Nogoceke, E., Koertvely, E., Jongerius, I., Kuijpers, T. W., & den Hollander, A. I. (2021). Common haplotypes at the CFH locus and low-frequency variants in CFHR2 and CFHR5 associate with systemic FHR concentrations and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*, *108*(8), 1367-1384. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.06.002.
81. Pappas, C. M., Zouache, M. A., Matthews, S., Faust, C. D., Hageman, J. L., Williams, B. L., Richards, B. T., & Hageman, G. S. (2021). Protective chromosome 1q32 haplotypes mitigate risk for age-related macular degeneration associated with the CFH-CFHR5 and ARMS2/HTRA1 loci. *Hum Genomics*, *15*(60), 1-15. doi: 10.1186/s40246-021-00359-8.
82. Ghezzi, P., & Cerami, A. (2005). Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Molecular biotechnology*, *31*(3), 239-244. <https://doi.org/10.1385/MB:31:3:239>

83. Matušková, V., Zeman, T., Ewerlingová, L., Hlinomazová, Z., Souček, J., Vlková, E., Goswami, N., Balcar, V. J., & Šerý, O. (2020). An association of neovascular age-related macular degeneration with polymorphisms of CFH, ARMS2, HTRA1 and C3 genes in Czech population. *Acta Ophthalmologica*, 98(6), e691-e699. doi: 10.1111/aos.14357.
84. Askari, M., Nikpoor, A. R., Gorjipour, F., Mazidi, M., Sanati, M. H., Aryan, H., Irani, A., Falavarjani, K. G., Nazari, H., & Mousavizadeh, K. (2015). Association of Htra1 gene polymorphisms with the risk of developing AMD in Iranian population. *Rep Biochem Mol Biol*, 4(1): 43-49.
85. GeneCards – the human gene database. CFH Gene – Complement Factor H. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFH>.
86. Cho, H. Y., Park, H. S., Ko, E. J., Ryu, C. S., Kim, J. O., Kim, Y. R., Ahn, E. H., Lee, W. S., & Kim, N. K. (2020). Association of Complement Factor D and H Polymorphisms with Recurrent Pregnancy Loss. *Int J Mol Sci*, 21(17), 1-10. doi: 10.3390/ijms21010017. 99
87. Liao, X., Lan, C., Cheuk, I., & Tan, Q. (2016). Four complement factor H gene polymorphisms in association with AMD: A meta-analysis. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 64, 123-129. doi: 10.1016/j.archger.2016.01.011.
88. Tran, M. T. N., Khalid, M. K. M. N., Pébay, A., Cook, A. L., Liang, H. H., Wong, R. C. B., Craig, J. E., Liu, G., Hung, S. S., & Hewitt, A. W. (2019). Screening of CRISPR/Cas base editors to target the AMD high-risk Y402H complement factor H variant. *Mol Vis*, 25, 174-182.
89. Maugeri, A., Barchitta, M., & Agodi, A. (2018). The association between complement factor H rs1061170 polymorphism and age-related macular

- degeneration: a comprehensive meta-analysis stratified by stage of disease and ethnicity. *Acta Ophthalmologica*, 97(1), e8-e21. doi: 10.1111/aos.13849.
90. Li, Y., Yuan, J., Rothzerg, E., Wu, X., Xu, H., Zhu, S., & Xu, J. (2020). Molecular structure and the role of high-temperature requirement protein 1 in skeletal disorders and cancers. *Cell Prolif*, 53(2), 1-9. doi: 10.1111/cpr.12746.
91. Babanejad, M., Moein, H., Akbari, M. R., Badiei, A., Yaseri, M., Soheilian, M., & Najmabadi, H. (2016). Investigating the CFH Gene Polymorphisms as a Risk Factor for Age-related Macular Degeneration in an Iranian Population. *Ophthalmic Genet*, 37(2), 144-149. doi: 10.3109/13816810.2014.955585.
92. El-Tahan, R. R., Ghoneim, A. M., & El-Mashad, N. (2016). TNF- α gene polymorphisms and expression. *SpringerPlus*, 5(1508), 1-7. doi: 10.1186/s40064-016-3197-y.
93. GeneCards – the human gene database. TNF Gene - Tumor Necrosis Factor. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF>.
94. Ahmed, R., Sharif, D., Jaf, M., & Amin, D. M. (2020). 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. doi: 10.2147/CCID.S272970.
95. Shi, L., Zhang, L., Zhang, D., Zhou, J., Jiang, X., Jin, Y., & Chang, W. (2021). Association between TNF- α G-308A (rs1800629) polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Periodontal Res*, 56(2), 226-235. doi: 10.1111/jre.12820.
96. Zhang, Y., Cao, Y., Xin, L., Gao, N., & Liu, B. (2018). Association between rs1800629 polymorphism in tumor necrosis factor- α gene and dilated cardiomyopathy susceptibility. *Medicine (Baltimore)*, 97(50), 1-8. doi: 10.1097/MD.00000000000013386.
97. Golovin–Sivtsev table Retrieved from https://dbpedia.org/page/Golovin%E2%80%93Sivtsev_table

98. Завгородня Н. Г. Вікова макулярна дегенерація: сучасний погляд на проблему : навч. посіб. для інтернів за спец. «Офтальмологія» / Н. Г. Завгородня, Л. Е. Саржевська, І. О. Поплавська. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2020. – 71 с.
99. Liutkeviciene, R., Vilkeviciute, A., Gedvilaite, G., Kaikaryte, K., & Kriauciuniene, L. (2019). Haplotypes of HTRA1 rs1120638, TIMP3 rs9621532, VEGFA rs833068, CFI rs10033900, ERCC6 rs3793784, and KCTD10 rs56209061 Gene Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. *Dis Markers*. 2019(9602949), 1-11. doi: 10.1155/2019/9602949.
100. National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information. HTRA1 HtrA serine peptidase 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5654>.
101. Colijn, J. M., Buitendijk, G., Prokofyeva, E., Alves, D., Cachulo, M. L., Khawaja, A. P., Coughard-Gregoire, A., Merle, B., Korb, C., Erke, M. G., Bron, A., Anastasopoulos, E., Meester-Smoor, M. A., Segato, T., Piermarocchi, S., de Jong, P., Vingerling, J. R., Topouzis, F., Creuzot-Garcher, C., Bertelsen, G., ... European Eye Epidemiology (E3) consortium (2017). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology*, 124(12), 1753–1763.
<https://doi.org/10.1016/j.opthta.2017.05.035>
102. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/infographics-pdf/world-vision-infographic-final.pdf?sfvrsn=85b7bcde_2
103. Mitchell, P., Liew, G., Gopinath, B., & Wong, T. Y. (2018). Age-related macular degeneration. *Lancet* (London, England), 392(10153), 1147–1159.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31550-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31550-2)
104. Gheorghe, A., Mahdi, L., & Musat, O. (2015). AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *Romanian journal of ophthalmology*, 59(2), 74–77.

105. Al-Zamil, W. M., & Yassin, S. A. (2017). Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clinical interventions in aging*, 12, 1313–1330. <https://doi.org/10.2147/CIA.S143508>
106. Stahl A. (2020). The Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Deutsches Arzteblatt international*, 117(29-30), 513–520. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0513>
107. García-Layana, A., Cabrera-López, F., García-Arumí, J., Arias-Barquet, L., & Ruiz-Moreno, J. M. (2017). Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. *Clinical interventions in aging*, 12, 1579–1587. <https://doi.org/10.2147/CIA.S142685>
108. Kaarniranta, K., Tokarz, P., Koskela, A., Paterno, J., & Blasiak, J. (2017). Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration. *Cell biology and toxicology*, 33(2), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9371-8>
109. Rastoin, O., Pagès, G., & Dufies, M. (2020). Experimental Models in Neovascular Age Related Macular Degeneration. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4627. <https://doi.org/10.3390/ijms21134627>
110. Kaarniranta, K., Tokarz, P., Koskela, A., Paterno, J., & Blasiak, J. (2017). Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration. *Cell biology and toxicology*, 33(2), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9371-8>
111. Heesterbeek, T. J., Lorés-Motta, L., Hoyng, C. B., Lechanteur, Y., & den Hollander, A. I. (2020). Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*, 40(2), 140–170. <https://doi.org/10.1111/opo.12675>
112. Chernykh, V., Shevchenko, A., Konenkov, V., Prokofiev, V., Eremina, A., & Trunov, A. (2019). TNF- α gene polymorphisms: association with age-

- related macular degeneration in Russian population. *International journal of ophthalmology*, 12(1), 25–29. <https://doi.org/10.18240/ijjo.2019.01.04>
113. Spaide, R. F., Jaffe, G. J., Sarraf, D., Freund, K. B., Sadda, S. R., Staurenghi, G., Waheed, N. K., Chakravarthy, U., Rosenfeld, P. J., Holz, F. G., Souied, E. H., Cohen, S. Y., Querques, G., Ohno-Matsui, K., Boyer, D., Gaudric, A., Blodi, B., Bauman, C. R., Li, X., Coscas, G. J., ... Fujimoto, J. (2020). Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data: Consensus on Neovascular Age-Related Macular Degeneration Nomenclature Study Group. *Ophthalmology*, 127(5), 616–636. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2019.11.004>
114. Sadda, S. R., Guymer, R., Holz, F. G., Schmitz-Valckenberg, S., Curcio, C. A., Bird, A. C., Blodi, B. A., Bottoni, F., Chakravarthy, U., Chew, E. Y., Csaky, K., Danis, R. P., Fleckenstein, M., Freund, K. B., Grunwald, J., Hoyng, C. B., Jaffe, G. J., Liakopoulos, S., Monés, J. M., Pauleikhoff, D., ... Staurenghi, G. (2018). Consensus Definition for Atrophy Associated with Age-Related Macular Degeneration on OCT: Classification of Atrophy Report 3. *Ophthalmology*, 125(4), 537–548. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2017.09.028>
115. Pennington KL, DeAngelis MM. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis (Lond)*. 2016 Dec 22;3:34. doi: 10.1186/s40662-016-00635.
116. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY; MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5;355(14):1419-31. doi: 10.1056/NEJMoa054481.
117. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM. Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the

- Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology*. 1999 Jun;106(6):1049-55. doi: 10.1016/S0161-6420(99)902671.
118. Kawasaki R, Wang JJ, Ji GJ, Taylor B, Oizumi T, Daimon M, Kato T, Kawata S, Kayama T, Tano Y, Mitchell P, Yamashita H, Wong TY. Prevalence and risk factors for age-related macular degeneration in an adult Japanese population: the Funagata study. *Ophthalmology*. 2008 Aug;115(8):1376-81, 1381.e1-2. doi: 10.1016/j.optha.2007.11.015. Epub 2008 Jan 25.
119. Миронова, Эмилия Михайловна. Роль пигментного эпителия и взаимодействующих с ним структур в патогенезе глазных заболеваний : диссертация ... доктора биологических наук : 14.00.16 / Ун-т дружбы народов им. П. Лумумбы. - Москва, 1990. - 389 с. : ил. Патологическая физиология OD 71 92-3/126 .
120. De Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5;355(14):1474-85. doi: 10.1056/NEJMra062326.
121. Jack Kanski Brad Bowling Kanski's Clinical Ophthalmology 8th Edition A Systematic Approach p.598 .
122. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res*. 2003 Jan;22(1):1-29. doi: 10.1016/s1350-9462(02)00043-5.
123. Stone EM. Macular degeneration. *Annu Rev Med*. 2007;58:477-90. doi: 10.1146/annurev.med.58.111405.133335.
124. Simha A, Braganza A, Abraham L, Samuel P, Lindsley K. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular glaucoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Oct 2;10(10):CD007920. doi: 10.1002/14651858.
125. Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med*. 2012 Aug;33(4):467-86. doi: 10.1016/j.mam.2012.04.004.

126. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Mar 1;4(3):a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049.
127. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol.* 2003 May-Jun;48(3):257-93. doi: 10.1016/s0039-6257(03)00030-44.
128. Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011 Dec;74(6):522-47. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02602.x.
129. Wong W.L., Su X., Li X., et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2014;2(2):106–116.
130. Song P., Du Y., Chan K.Y., Theodoratou E., Rudan I. The national and subnational prevalence and burden of age-related macular degeneration in China. *J Glob Health.* 2017;7(2)
131. Chakravarthy U., Elisabeth P., Astrid F., et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 2010;10(1)
132. Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE: Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2007, 114(2):253-262.
133. Klaver CC, Assink JJ, van Leeuwen R, Wolfs RC, Vingerling JR, Stijnen T, Hofman A, de Jong PT: Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42(10):2237-2241.

134. Hu CC, Ho JD, Lin HC: Neovascular age-related macular degeneration and the risk of stroke: a 5-year population-based follow-up study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2010, 41(4):613-617.
135. Tan JS, Wang JJ, Liew G, Rochtchina E, Mitchell P: Age-related macular degeneration and mortality from cardiovascular disease or stroke. *The British journal of ophthalmology* 2008, 92(4):509-512.
136. van Leeuwen R, Ikram MK, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, de Jong PT: Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44(9):3771-3777.
137. Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher A, Owen CG: Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2012, 119(3):571-580.
138. Mares JA, Voland RP, Sondel SA, Millen AE, Larowe T, Moeller SM, Klein ML, Blodi BA, Chappell RJ, Tinker L et al: Healthy lifestyles related to subsequent prevalence of age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology* 2011, 129(4):470-480
139. Connell PP, Keane PA, O'Neill EC, Altaie RW, Loane E, Neelam K, Nolan JM, Beatty S: Risk factors for age-related maculopathy. *Journal of ophthalmology* 2009, 2009:360764.
140. Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC: The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Archives of ophthalmology* 2005, 123(3):321-327.
141. Fritsche L.G., Fariss R.N., Stambolian D., Abecasis G.R., Curcio C.A., Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genom Hum Genet.* 2014;15:151–171.

142. Klein R.J., Zeiss C., Chew E.Y., et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385–389.
143. Haines J.L., MHauser M.A., Schmidt S., et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):419–421.
144. Kaur L., Katta S., Reddy R.K., et al. The involvement of complement factor B and complement component C2 in an Indian cohort with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):59–63.
145. Johnson L.V., Leitner W.P., Staples M.K., Anderson D.H. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2001;73(6):887–896.
146. Nozaki M., Raisler B.J., Sakurai E., et al. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(7):2328–2333.
147. Ennis S., Gibson J., Cree A.J., Collins A., Lotery A.J. Support for the involvement of complement factor I in age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(1):15–16.
148. . Yang Z., Tong Z., Chen Y., et al. Genetic and functional dissection of HTRA1 and LOC387715 in age-related macular degeneration. *PLoS Genet*. 2010;6(2)
149. Wang G., Spencer K.L., Scott W.K., et al. Analysis of the indel at the ARMS2 3'UTR in age-related macular degeneration. *Hum Genet*. 2010;127(5):595–602.
150. Gass JD. Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1972;70:409-36.
151. Малачкова Н. В., Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех (2022). Вивчення взаємодій між поліморфізмом гена CFH та фенотипом

- пігментного епітелію сітківки при віковій дегенерації макули. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(3), 369-375.
152. Malachkova, N. V., Mohammad Mashhour Mohammad Masa'deh (2022). Investigation of the effect of TNF- α on damage to retinal pigment epithelial cells in age-related macular degeneration. *Reports of Morphology*, 28(1),34-41.
153. Малачкова Н. В., Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех (2022). Вивчення взаємодій між поліморфізмом гена HTRA1 та фенотипом пігментного епітелію сітківки при віковій дегенерації макули. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(2), 260-266.
154. Малачкова Н. В., Маса'дех, М. М. М., Аль-Джаррах О. М. М., Людкевич Г. П., Сухань Д. С. (2021). Сучасний погляд на етіопатогенез вікової макулярної дегенерації та роль молекулярно-генетичних детермінант у ньому. *Архів офтальмології України*, 9(3), 21-27.
155. Малачкова, Н.В., Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад (2022). Вивчення ролі комбінації певних генотипів у виникненні та перебігу вікової макулярної дегенерації. *Scientific Collection «InterConf»*, (127): 1st ISPC «Modern Directions and Movements in Science» (October 6-8, 2022; Luxembourg, Grand Duchy of Luxembourg)., С 178–180.
156. Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад, Малачкова Н. В. (2022). Зв'язок між поліморфізмом гена CFH та віковою макулярною дегенерацією. *Scientific Collection «InterConf»*, (130). 1st International Scientific and Practical Conference «Science and Education in Progress» (October 26-28, 2022; Dublin, Ireland)., С 255–256.
157. Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад, Малачкова Н. В. (2022). Зв'язок між поліморфізмом гена TNF та віковою макулярною дегенерацією. *Scientific Collection «InterConf»*, (128). 13th ISPC «Science

and Practice: Implementation to Modern Society» (October 16-18, 2022; Manchester, Great Britain)..,C 182–183.

ДОДАТКИ

Додаток № 1. Акти впровадження результатів роботи у науковій та практичній діяльності.


 «ТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Вінницького національного медичного
 університету ім. М.І. Пирогова
 проф. Олег ВЛАСЕНКО
 « 27 » Серпень 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Використання молекулярно-генетичного методу для прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації.

2. **Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра очних хвороб, м. Вінниця, вул.Пирогова, 56, 21000, Україна.

Розроблювач: Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех.

Джерела інформації: Malachkova, N. V., & Mohammad Mashhour, M. M. (2022). Investigation of the effect of TNF- α on damage to retinal pigment epithelial cells in age-related macular degeneration. Reports of Morphology, 28(1),34-41.

Базова установа, яка проводить впровадження: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра очних хвороб

3. **Результати застосування пропозицій** за період з квітня по грудень 2022 р. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри очних хвороб на практичних заняттях.

• **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів та лікарів офтальмологів щодо ефективності новітніх методів прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації.

4. **Зауваження, пропозицій:** не вносилися.

5. **Затверджено** на засіданні кафедри 29.08 2022 р. (протокол № /)

Відповідальний за впровадження: доц. Жмудь Т.М.

Завідувач кафедри очних хвороб
 Вінницького національного
 медичного університету ім. М.І. Пирогова,
 кандидат медичних наук, професор


 Наталія МАЛАЧКОВА



ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Вінницького національного медичного

університету ім. М.І. Пирогова

проф. Олег ВЛАСЕНКО

« 24 » серпня 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Використання молекулярно-генетичного методу для прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації.

2. **Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра очних хвороб, м. Вінниця, вул.Пирогова, 56, 21000, Україна.

Розроблювач: Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех.

Джерела інформації: Малачкова Н. В., Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех (2022). Вивчення взаємодій між поліморфізмом гена CFH та фенотипом пігментного епітелію сітківки при віковій дегенерації макули. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(3), 369-375

Базова установа, яка проводить впровадження: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра медичної біології

3. **Результати застосування пропозиції** за період з вересня по грудень 2022 р. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри медичної біології на практичних заняттях.

• **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо ефективності новітніх методів прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації.

4. **Зауваження, пропозицій:** не вносилися.

5. **Затверджено** на засіданні кафедри 26.08. 2022 р. (протокол №1)

Завідувач кафедри медичної біології
Вінницького національного
медичного університету ім. М.І. Пирогова,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Володимир ШКАРУПА

ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Заступник директора ТОВ «ОПТИМАЛ-М»
 м.Вінниця
 Наумчук А. Л.
 2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Використання молекулярно-генетичного методу для прогнозування розвитку вікової макулярної дегенерації.

2. **Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра очних хвороб, м. Вінниця, вул.Пирогова, 56, 21000, Україна.

Розроблювач: Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех.

Джерела інформації: Malachkova, N. V., & Mohammad Mashhour, M. M. (2022). Study of interactions between HTRA1 gene polymorphism and retinal pigment epithelial phenotype in age-related macular degeneration. Reports of Vinnitsia National Medical University, 26(2), 260-266.

Базова установа, яка проводить впровадження: Медичний центр ТОВ «ОПТИМАЛ-М»

3. **Результати застосування пропозиції** за період з липня по жовтень 2022 р. Матеріали використовуються у лікувальному процесі .

• **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у лікувальному процесі дозволяє прогнозувати розвиток вікової макулярної дегенерації.

4. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Наумчук А. Л.

Додаток № 2. Список публікацій та апробацій здобувача за темою дисертації:

1. Малачкова Н. В., Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех (2022). Вивчення взаємодій між поліморфізмом гена CFH та фенотипом пігментного епітелію сітківки при віковій дегенерації макули. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(3), 369-375.
2. Malachkova, N. V., Mohammad Mashhour Mohammad Masa'deh (2022). Investigation of the effect of TNF- α on damage to retinal pigment epithelial cells in age-related macular degeneration. Reports of Morphology, 28(1),34-41.
3. Малачкова Н. В., Мохаммад Машхур Мохаммад Маса'дех (2022). Вивчення взаємодій між поліморфізмом гена HTRA1 та фенотипом пігментного епітелію сітківки при віковій дегенерації макули. Вісник Вінницького національного медичного університету, 26(2), 260-266.
4. Малачкова Н. В., Маса'дех, М. М. М., Аль-Джаррах О. М. М., Людкевич Г. П., Сухань Д. С. (2021). Сучасний погляд на етіопатогенез вікової макулярної дегенерації та роль молекулярно-генетичних детермінант у ньому. Архів офтальмології України, 9(3), 21-27.
5. Малачкова, Н.В., Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад (2022). Вивчення ролі комбінації певних генотипів у виникненні та перебігу вікової макулярної дегенерації. *Scientific Collection «InterConf»*, (127): 1st ISPC «Modern Directions and Movements in Science» (October 6-8, 2022; Luxembourg, Grand Duchy of Luxembourg)., С 178–180.
6. Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад, Малачкова Н. В. (2022). Зв'язок між поліморфізмом гена CFH та віковою макулярною дегенерацією. *Scientific Collection «InterConf»*, (130). 1st International Scientific and Practical

Conference «Science and Education in Progress» (October 26-28, 2022; Dublin, Ireland), С 255–256.

7. Маса'дех Мохаммад Машхур Мохаммад, Малачкова Н. В. (2022). Зв'язок між поліморфізмом гена TNF та віковою макулярною дегенерацією. Scientific Collection «InterConf», (128). 13th ISPC «Science and Practice: Implementation to Modern Society» (October 16-18, 2022; Manchester, Great Britain), С 182–183.