

(15)

Wpływ polimorfizmów genu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF-A na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF u chorych na wysiękową postać zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem

The effect of vascular endothelial growth factor VEGF-A gene polymorphisms and intravitreal anti-VEGF treatment outcomes in patients with exudative age-related macular degeneration

Agnieszka Kubicka-Trzaska¹, Izabella Karska-Basta¹, Sylwia Dziedzina², Marek Sanak²,
Bożena Romanowska-Dixon¹

¹ Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej Katedry Okulistyki Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bożena Romanowska-Dixon

² Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marek Sanak

Abstrakt:

Cel: określenie związku między polimorfizmami genu kodującego czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego *VEGF-A* (rs2146323; rs699947) a ryzykiem wystąpienia wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem oraz ocena ich wpływu na efekt leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF.

Materiał i metody: badaniami objęto 106 chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem leczonych doszkliskowymi iniekcjami ranibizumabu i/lub bewacyzumabu. W ocenie skuteczności leczenia porównywano wyjściową najlepszą skorygowaną ostrość wzroku oraz grubość centralnej siatkówki zobrazowaną badaniem optycznej koherentnej tomografii z wynikami badań kontrolnych wykonywanych co miesiąc. Okres obserwacji wynosił 6 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiło 60 osób, u których wykluczono zwyrodnienie plamki związane z wiekiem. Badania przeprowadzono z użyciem genotypowania technologią TaqMan firmy Applied Biosystems.

Wyniki: polimorfizm rs2146323 genu *VEGF-A* nie wykazał związku z rozwojem zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem, miał natomiast wpływ na wyniki leczenia doszkliskowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF. Osoby z genotypem CC w polimorfizmie *VEGF-A* rs2146323 lepiej reagowały na leczenie niż osoby z genotypem AC. Pod koniec okresu obserwacji u chorych na zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, u których stwierdzono genotyp CC w polimorfizmie *VEGF-A* rs2146323, odnotowano lepszą ostateczną najlepszą skorygowaną ostrość wzroku i we wszystkich tych przypadkach istotną redukcję centralnej grubości siatkówki w porównaniu do odnośnych parametrów u osób bez tego genotypu [OR = 2,65, 95% CI (1,17–5,99); p = 0,0171]. U chorych niereagujących na leczenie lub reagujących słabo (25,47%) genotyp CC polimorfizmu rs2146323 występował w 28,85% przypadków, genotyp AC tego polimorfizmu natomiast – w 61,54% przypadków (p = 0,0128). Nie wykazano zależności między występowaniem polimorfizmu rs699947 *VEGF-A* a rozwojem zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem, jak i jego wpływu na wyniki leczenia u chorych z badanej grupy.

Wnioski: wyniki naszych obserwacji wykazały, że polimorfizmy rs2146323 oraz rs699947 *VEGF-A* nie mają wpływu na rozwój zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem. Polimorfizm rs2146323 jednakże moduluje odpowiedź na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF. Genotyp CC tego polimorfizmu kojarzy się z lepszą odpowiedzią, genotyp AC zaś jest związany ze słabą odpowiedzią na miejscowe leczenie antyangiogenne.

Słowa kluczowe:

czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, polimorfizm genowy, zwyrodnienie plamki związane z wiekiem.

Abstract:

Aim: To analyse the correlation between the rs2146323 and rs699947 polymorphisms of *VEGF-A* gene and the risk of age-related macular degeneration and response to anti-VEGF therapy in affected patients.

Material and methods: 106 patients with exudative age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab or bevacizumab were enrolled. Treatment response was assessed at 4-week intervals for 6 months and was based on the best corrected visual acuity and central retinal thickness compared to the baseline status. The control group included 60 subjects without age-related macular degeneration. Genetic testing (TaqMan Applied Biosystems) was performed in all cases.

Results: There was no correlation between the rs2146323 polymorphism of *VEGF-A* gene and age-related macular degeneration; yet, there was a correlation between this polymorphism and anti-VEGF treatment outcomes. Patients with CC genotype of rs2146323 *VEGF-A* polymorphism demonstrated significantly better treatment response. At the end of a follow-up, age-

-related macular degeneration patients with positive CC genotype of rs2146323 *VEGF-A* gene polymorphism had final better best corrected visual acuity and showed significant central retinal thickness reduction as compared to individuals negative for this genotype (OR = 2.65, 95% CI (1.17–5.99); $p = 0.0171$). Among the 25.47% of “non-responders”, genotype CC of rs2146323 *VEGF-A* was present in 28.85% of cases, while genotype AC was detected in 61.54% of cases ($p = 0.0128$). There was no correlation between rs699947 *VEGF-A* polymorphism and either age-related macular degeneration or response to anti-VEGF treatment.

Conclusions: The study showed that rs2146323 and rs699947 *VEGF-A* polymorphisms are not associated with increased risk of age-related macular degeneration. However, the rs2146323 *VEGF-A* polymorphism modulated the response to anti-VEGF therapy. Genotype CC of rs2146323 was associated with an improved response to anti-VEGF treatment, while patients with genotype AC of rs2146323 showed worse functional and anatomical response to anti-VEGF agents.

Key words:

vascular endothelial growth factor, genetic polymorphism, age-related macular degeneration.

Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów w związku z publikowaną pracą/ The authors declare no conflict of interest

Wprowadzenie

Śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) odgrywa kluczową rolę w regulacji angiogenezy, jest odpowiedzialny za wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz wykazuje aktywność prozapalną (1). Wszystkie te zjawiska są zaangażowane w etiopatogenezę i są odpowiedzialne za obraz kliniczny wysiękowej postaci zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (Age-related Macular Degeneration – AMD). Dowodem na istotne znaczenie czynnika VEGF w rozwoju AMD są stwierdzane w płynach wewnątrzgałkowych wysokie stężenia tego czynnika oraz wysoka ekspresja tej proteiny w usuwanych chirurgicznie błonach neowaskularnych (Choroidal Neovascularization – CNV) (2–4). Obecnie standardem leczenia wysiękowej postaci AMD są dośzklistkowe iniekcje czynnika anty-VEGF (5, 6). Tę terapię charakteryzują wysokie skuteczność i bezpieczeństwo. Obserwuje się jednak pewne różnice w odpowiedzi na leczenie; około 20–30% chorych na wysiękową postać AMD nie reaguje na miejscową terapię antyangiogenną (7). Ponadto wyniki badań klinicznych wykazały różnice międzypopulacyjne w liczbie podanych iniekcji, koniecznych do uzyskania pełnej kontroli nad toczącym się procesem zwyrodnieniowym w plamce i pozwalających na utrzymanie korzystnego efektu anatomicznego oraz funkcjonalnego. Uważa się, że różna odpowiedź na leczenie antyangiogenne jest uzależniona od czynników genetycznych (8–10). Obecnie opisuje się 36 genów mających związek z rozwojem i progresją AMD (8). Na pierwszym miejscu należy wymienić geny kodujące białka układu dopełniacza: CFH (complement factor H), CFB (*complement factor B*), C2, C3 i CFI (*complement factor I*) (9). Równie ważnymi genami dla rozwoju AMD są: gen kodujący proteazę serynową zależną od wysokiej temperatury 1 (HTRA1 – *high temperature requirement A serine peptidase-1*) i gen wrażliwości rozwoju makulopatii związanej z wiekiem 2 (ARMS2 – *age-related maculopathy susceptibility-2*) (10). Pierwszy z nich reguluje aktywność komórkowego oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1 – *insulin-growth factor-1*), drugi koduje białko, którego funkcja nie została jeszcze poznana, po raz pierwszy wykryto go w łożysku, a następnie w komórkach siatkówki. Kolejne zidentyfikowane geny mające związek z AMD to: COL8A1/FILIP1L, IER3-DDR1, SLC16A8, TGFBR1, RAD51B, ADAMTS9, B3GALT1, VEGF-A (11). Opublikowane wyniki badań pokazały, że niektóre warianty ww. genów pełnią rolę nie tylko wskaźnika rozwoju i progresji choroby,

ale mogą być cennym markerem farmakogenetycznym, który pozwala przewidzieć odpowiedź na wdrożone leczenie antyangiogenne. Jednym z takich genów jest gen kodujący VEGF-A, zlokalizowany na chromosomie 6p21.3. *VEGF-A* jest zbudowany z 8 eksonów oraz 7 intronów (12, 13). Zidentyfikowano ponad 20 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) w *VEGF-A*. Część z nich wykazuje dużą aktywność i reguluje ekspresję czynnika VEGF-A oraz modyfikuje jego właściwości angiogenne (14). Wydaje się zatem oczywiste, że różnorodność wariantów *VEGF-A* przekłada się na zróżnicowanie stopni ekspresji czynnika VEGF-A lub wariantów występowania tego białka, a to z kolei może decydować o odmiennej odpowiedzi na leki z grupy anty-VEGF (15). Najczęściej badanymi wariantami genowymi białka VEGF-A u chorych na AMD są polimorfizmy: rs699946, rs699947, rs2146323, rs833069, rs833070, rs1413711 i rs20110963 (16). Dotychczas uzyskane wyniki badań klinicznych jednak nie są jednoznaczne, a obserwowane w nich różnice wynikają m.in. z różnorodności badanej populacji.

Cel

Według przedstawionych powyżej założeń przeprowadzono badanie, którego celem była analiza występowania związku między wybranymi polimorfizmami genu kodującego czynnika VEGF-A (rs2146323, rs699947) a ryzykiem występowania wysiękowej postaci AMD (AMD) i jego określenie oraz wykazanie zależności między ww. wariantami genów a odpowiedzią na leczenie dośzklistkowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF.

Material i metody

Badaniami objęto 106 chorych na wysiękową postać AMD leczonych dośzklistkowymi iniekcjami ranibizumabu i/lub bewacyzumabu w Klinice Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ CM w Krakowie w latach 2013–2015. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z zasadami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej. We wszystkich przypadkach przeprowadzono wstępne badanie okulistyczne obejmujące ocenę najlepszej skorygowanej ostrości wzroku (Best Corrected Visual Acuity – BCVA), pomiar ciśnienia wewnątrzgałkowego, ocenę przedniego odcinka i dna oka, wykonanie kolorowej fotografii dna oka (fundus kamera Topcon-TRC-50DX, Japonia), badanie centralnej grubości siatkówki (Central Retinal Thickness – CRT) w optycznej koherentnej tomografii (Optical Coherence Tomography – OCT) (Topcon

3D OCT 2000, Japonia) oraz angiografię fluoresceinową (Fluorescein Angiography – FA) (Topcon, TRC-50DX/A, Japonia). Badania kontrolne przeprowadzono co 4 tygodnie, a obejmowały one ocenę wszystkich parametrów badania wyjściowego z wyjątkiem wyników FA.

Leczenie doszklistkowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF (ranibizumabem 0,5 mg/ 0,05 ml, bewacyzumabem 1,25 mg/ 0,5 ml) obejmowało dwie fazy: „nasycającą” – każdy chory otrzymywał trzy kolejne iniekcje czynnika anty-VEGF w odstępach miesięcznych, i „podtrzymującą” – leczenie prowadzono na podstawie wyniku badania klinicznego *pro re nata*, tj. „w razie potrzeby”.

Grupę kontrolną stanowiło 60 osób, które dobrano pod względem płci i wieku spośród osób operowanych w naszej klinice z powodu zaćmy starczej, u których wykluczono obecność AMD oraz innych schorzeń okulistycznych. W przeprowadzonych wywiadach lekarskich, zebranych zarówno od badanych z grupy chorych na AMD, jak i od badanych z grupy porównawczej, nie stwierdzono rodzinnego występowania chorób dziedzicznych i nowotworowych.

Protokół badania uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej UJ (zgodą nr 122.6120.214.2016). Od każdego uczestnika uzyskano świadomą pisemną zgodę na udział w badaniu oraz pobrano jednorazowo do oznaczeń genetycznych 4,5 ml pełnej krwi (Vacutainer K3EDTA). Z uzyskanego z tego materiału DNA zbadano polimorfizmy *VEGF-A* rs2146323 oraz rs699947.

Izolacja DNA

Do pełnej krwi dodawano 6-procentowy roztwór wielkocząsteczkowego dekstranu (Dexstran T500, Pharmacia) w celu sedymentacji erytrocytów. Bogate w leukocyty osocze odciągano i wirowano przez 10 min/20000 x g. DNA izolowano z osadu leukocytów metodą Chomczyński i Sacchi (DNAzol 0,4 ml, Applied Biosystems). Ta metoda polega na lizie komórek izotiocyanianem guanidyny, który dzięki rozbiciu wiązań wodorowych powoduje całkowite uwolnienie DNA z kompleksów jądrowych z białkami histonowymi. Po precipitacji DNA i przemyciu roztworem etanolu DNA było przechowywane w temperaturze -20°C w postaci roztworu wodnego.

Genotypowanie metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

DNA było amplifikowane w obecności swoistych starterów oraz sond oligonukleotydowych wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Podczas reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym („real-time PCR”) była rejestrowana fluorescencja w dwóch kanałach barwnych odpowiadających użytym sondom swoistym dla każdego z genotypowanych wariantów nukleotydowych. Użyto komercyjnych zestawów starterów i sond TaqMan (TaqMan TaqMan Genotyping Assays). Reakcja amplifikacji była przeprowadzana na płytkach 96-dołkowych w termocyklerze 7900 HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Wykorzystano komercyjną mieszaninę reakcyjną zawierającą roztwory substratów i polimerazy; TaqMan Universal Genotyping PCR Master Mix, mieszaninę oligonukleotydowych starterów i sond oraz DNA połączono w objętościach zalecanych przez producenta i zgodnie z zaleconym profilem termicznym (TaqMan Universal Genotyping PCR Master Mix Protocol – Applied Biosystems).

Odczyty genotypów zbadanych polimorfizmów zostały dokonane na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji automatycznie, z wykorzystaniem oprogramowania SDS wersja 2.04 (Applied Biosystems).

Analiza statystyczna

W badanych grupach istotność różnic między częstością alleli i genotypów oceniano za pomocą testu Chi². Analizę związków genotypów zbadanych polimorfizmów z występowaniem AMD przeprowadzono z wykorzystaniem modelu regresji logistycznej. Dla każdej pary obliczano wartość ilorazu szans (*odds ratio* – OR) oraz przedział ufności (95% PU). Wartości OR były następnie korygowane pod względem potencjalnych czynników zakłócających i podawane jako OR skorygowane. Analizę statystyczną i opracowanie wyników przeprowadzono za pomocą oprogramowania STATISTICA 10.0. Wartości *p* < 0,05 uznano za statystycznie istotne.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono szczegółową charakterystykę badanych z grupy chorych na AMD oraz z grupy porównawczej.

W tabeli II przedstawiono rozkład częstości genotypów i alleli dla dwóch zbadanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu *VEGF-A* rs2146323 i rs699947, a także wyniki regresji logistycznej w postaci skorygowanego OR u badanych z grupy chorych na AMD w odniesieniu do tego wskaźnika u badanych z grupy porównawczej. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w występowaniu poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów czynnika VEGFA między badanymi grupami, tj. grupą chorych na AMD i grupą chorych na zaćmę starczą stanowiącą grupę odniesienia. W przypadku ocenianych polimorfizmów VEGFA rs699947 oraz VEGFA rs2146323 u badanych z obu grup najczęściej stwierdzano obecność genotypu AC. To sugeruje brak związku między obecnością wariantów *VEGF-A* rs2146323 i rs699947 a ryzykiem zachorowania na wysiękową postać AMD (tab. II).

Na podstawie obserwacji postępu w leczeniu odnotowanego w czasie 6 miesięcy trwania badania stwierdzono natomiast, że polimorfizm rs2146323 miał wpływ na wyniki leczenia doszklistkowymi iniekcjami czynnika anty-VEGF. Osoby z genotypem CC dla rs2146323 lepiej reagowały na leczenie, podczas gdy u chorych, u których stwierdzono występowanie genotypu AC, odpowiedź była gorsza. Pod koniec okresu obserwacji chorzy na AMD, u których stwierdzono genotyp CC rs2146323, wykazali ostateczną lepszą BCVA i we wszystkich tych przypadkach odnotowano istotną redukcję CRT w porównaniu do odnośnych parametrów u osób nieposiadających tego genotypu [OR = 2,65, 95% CI (1,17–5,99); *p* = 0,0171], chorzy z genotypem AC natomiast mieli gorszą BCVA oraz wykazano u nich istotnie mniejszą redukcję CRT niż u osób bez tego polimorfizmu [OR = 0,28, 95% CI (0,13–0,65); *p* = 0,0023] (tab. III). Jednocześnie wykazano, że u chorych z genotypem CC rs2146323 podano średnio o 1,3 iniekcji doszklistkowej mniej niż u osób bez tego genotypu.

W okresie 6-miesięcznej obserwacji u 27 chorych (25,47%) obserwowano brak pozytywnej odpowiedzi na prowadzone miejscowe leczenie antyangiogenne. Pomimo leczenia nie uzyskano u nich poprawy funkcji leczonego oka, jak również poprawy morfologii dołka w badaniu OCT (ryc. 1., 2.). Za brak popra-

wy funkcji uznawano brak poprawy BCVA lub jej pogorszenie w stosunku do wyników badania wyjściowego o co najmniej 1 linię wg tablic Snellena. Parametrami, za pomocą których oceniano morfologię dołka, były wartości pomiaru CRT oraz wyniki oceny ilości płynu śródsiatkawkowego pod częścią neurosenso-ryczną siatkówki oraz pod nabłonkiem barwnikowym siatkówki (Retinal Pigment Epithelium – RPE). Brak dobrego efektu leczenia definiowano jako brak zmian w wartościach CRT lub reduk-

cję CRT o mniej niż 50,0 μm , utrzymujące się obrzęk plamki oraz płyn pod RPE i pod częścią neurosenso-ryczną siatkówki. Genotyp CC rs2146323 *VEGF-A* miało 28,85% tych chorych nieodpowiadających na leczenie lub odpowiadających na nie słabo, genotyp AC zaś – aż 61,54% chorych ($p = 0,012$) (tab. IV).

Nie wykazano zależności między występowaniem polimorfizmu rs699947 *VEGF-A* a wynikami leczenia pacjentów z badanej grupy (tab. V).

Badana cecha/ Studied characteristic	Grupa AMD/ AMD group liczba/ number n = 106	Grupa porównawcza/ Control group liczba/ number n = 60	Wartość p/ p value
Płeć/ Sex			0,020
kobiety/ females	70 (66%)	30 (53%)	
mężczyźni/ males	36 (34%)	28 (47%)	
Wiek/ Age	56–90 lat (śr. 71,2)	54–88 lat (śr. 68,4)	0,023
≤ 60 lat/ ≤ 60 years	13 (12,3%)	11 (18,9%)	
> 60 lat/ > 60 years	93 (87,7%)	47 (81,1%)	
Palenie tytoniu/ Smoking			0,089
obecnie/ w przeszłości / current/ former	31 (29%)	15 (25,8%)	
nigdy/ never	75 (71%)	43 (74,2%)	
Miejsce zamieszkania/ Living environment			0,017
miasto/ urban	74 (69,8%)	36 (62%)	
wieś/ rural	32 (30,2%)	22 (38%)	
Wywiad rodzinny/ Family history of AMD			0,003
pozytywny/ positive	24 (22,64%)	4 (4%)	
negatywny/ negative	82 (77,35%)	54 (96%)	

Tab. I. Charakterystyka chorych na AMD i badanych z grupy porównawczej.

Tab. I. Characteristics of AMD patients and controls.

Polimorfizm genu/ Gene polymorphism	Genotyp/ Genotype	Grupa porównawcza/ Control group n = 58	Grupa AMD/ AMD group n = 106	OR nieskorygowany (95% CI)/ Unadjusted OR (95% CI)	OR skorygowany (95% CI)/ Adjusted OR (95% CI)	p
VEGFA rs699947	AA	16 (26,23%)	30 (28,85%)	1,11 (0,54–2,29)	1,15 (0,56–2,28)	0,764
	AC	29 (48,33%)	52 (50,00%)	1,06 (0,56–2,03)	1,08 (0,58–2,13)	0,837
	CC	15 (25,00%)	22 (21,15%)	0,80 (0,38–1,71)	0,80 (0,38–1,71)	0,570
VEGFA rs2146323	AA	6 (9,84%)	13 (12,50%)	1,29 (0,46–3,61)	1,31 (0,44–3,65)	0,630
	AC	32 (52,46%)	49 (47,12%)	0,83 (0,44–1,58)	0,83 (0,44–1,58)	0,574
	CC	23 (37,7%)	42 (40,38%)	1,09 (0,57–2,10)	1,09 (0,57–2,10)	0,795

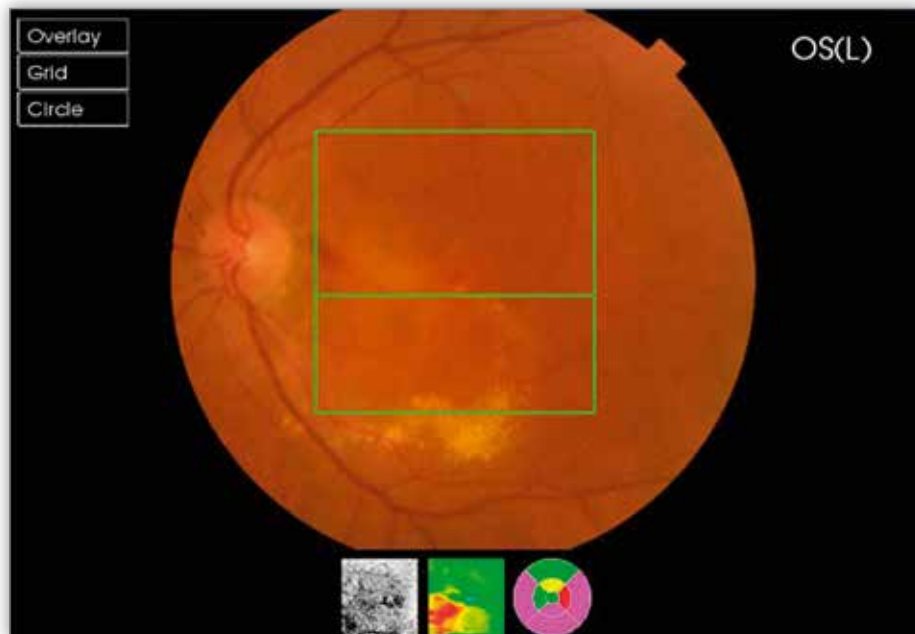
Tab. II. Rozkład genotypów i alleli dwóch badanych polimorfizmów genu VEGF-A rs2146323 oraz rs699947, a także wartości otrzymane dla analizy ilorazu szans (*odds ratio* – OR) u badanych z grupy chorych na AMD w odniesieniu do wartości u badanych z grupy porównawczej.

Tab. II. Distribution of genotypes and alleles of the rs2146323 and rs699947 polymorphisms of VEGF-A; odds ratio (OR) and its statistical significance for a comparison between AMD patients and controls.

Polimorfizm VEGFA rs2146323/ VEGFA rs2146323 polymorphism	Genotyp/ Genotype	OR nieskorygowany (95% CI)/ Unadjusted OR (95% CI)	OR skorygowany (95% CI)/ Adjusted OR (95% CI)	Wartość p/ p value
	CC	2,65 (1,17–5,99)	2,41 (1,11–5,75)	0,017
	AC	0,28 (0,13–0,65)	0,34 (0,11–0,57)	0,002
	AA	1,88 (0,58–6,12)	1,65 (0,52–5,98)	0,289

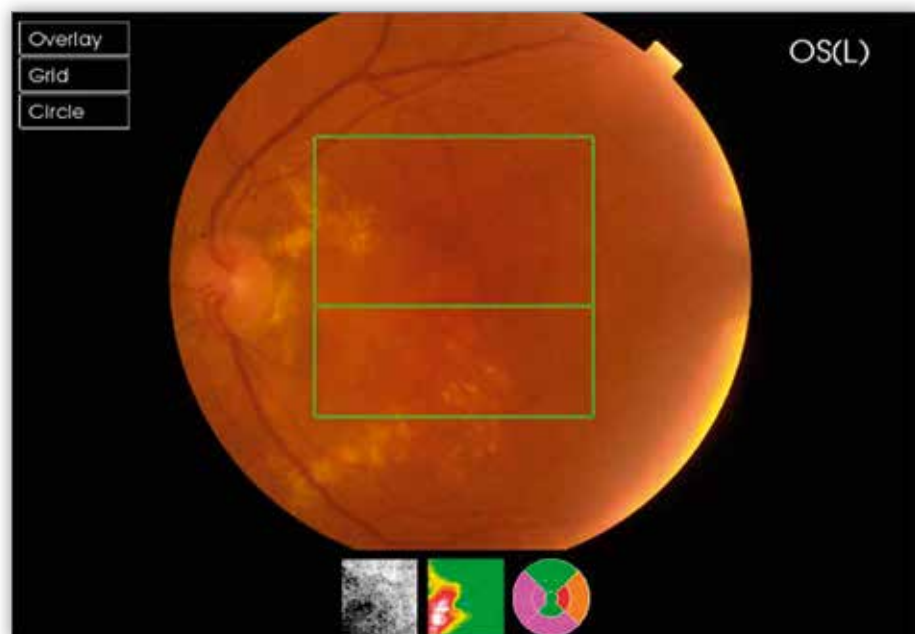
Tab. III. Rozkład genów i alleli polimorfizmu rs2146323 VEGF-A oraz analiza ilorazu szans (*odds ratio* – OR) u badanych z grupy chorych na AMD i z grupy porównawczej.

Tab. III. Distribution of genotypes and alleles of rs2146323 polymorphism of VEGF-A and odds ratio (OR) in AMD patients and controls.



Ryc. 1. Wyjściowe badanie optycznej koherentnej tomografii (OCT) – morfologia dołka w oku przed rozpoczęciem leczenia doszklistkowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF.

Fig. 1. Optical coherence tomography (OCT) at baseline – foveal scan prior to intravitreal anti-VEGF treatment commencement.



Ryc. 2. Optyczna koherentna tomografia (OCT) plamki w 6. miesiącu obserwacji od podania 6 doszklistkowych iniekcji czynnika anti-VEGF (3 iniekcji bevacyzumabu i 3 iniekcji ranibizumabu). Brak zmian w morfologii dołka.

Fig. 2. Optical coherence tomography (OCT) scan of macula after six intravitreal injections of anti-VEGF agents (3 bevacizumab and 3 ranibizumab injections).

	Genotyp/ Genotype	Słaba reakcja na leczenie/ Poor treatment response	Pozytywna reakcja na leczenie/ Good treatment response	Wartość p/ p value
Polimorfizm VEGFA rs2146323/ VEGFA rs2146323 polymorphism	CC	15 (28,85%)	27 (51,92%)	0,012
	AC	32 (61,54%)	17 (32,69%)	0,012
	AA	5 (9,62%)	8 (15,38%)	0,213

Tab. IV. Rozkład genotypów polimorfizmu rs2146323 VEGF-A w zależności od reakcji na leczenie doszklistkowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF u chorych z badanej grupy.

Tab. IV. Distribution of genotypes of rs2146323 polymorphism of VEGF-A in AMD patients by treatment response to anti-VEGF therapy.

	Genotyp/ Genotype	Słaba reakcja na leczenie/ Poor treatment response	Pozytywna reakcja na leczenie/ Good treatment response	Wartość p/ p value
Polimorfizm VEGFA rs699947/ VEGFA rs699947 polymorphism	CC	7 (11,54%)	15 (28,85%)	0,153
	AC	28 (53,85%)	24 (46,15%)	0,192
	AA	17 (32,96%)	13 (25,00%)	0,141

Tab. V. Rozkład genotypów polimorfizmu rs699947 VEGF-A w zależności od reakcji na leczenie doszklistkowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF u chorych z badanej grupy.

Tab. V. Distribution of genotypes of rs699947 VEGF-A polymorphism depending on reaction to anti-VEGF therapy in AMD group.

Omówienie

Zbadane przez nas dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w obrębie genu *VEGF-A*: rs2146323 oraz rs699947, zostały już wcześniej opisane jako odgrywające istotną rolę w patomechanizmie wielu schorzeń okulistycznych – np. retinopatii cukrzycowej, nowotworów złośliwych i wysiękowej postaci AMD (3). Polimorfizm rs2146323 jest zlokalizowany w obrębie regionu intronu 2. genu i pomimo to, że nie wpływa na sekwencję produkowanego polipeptydu, uczestniczy w regulacji jego ekspresji (2, 8). Wariant rs699947 *VEGF-A* natomiast znajduje się w regionie promotorowym genu, dlatego potencjalnie wpływa również na zmianę ekspresji tego białka, korelując ze zmiennym poziomem tego czynnika w surowicy i tkankach (2, 8).

Nie stwierdziliśmy w naszym badaniu, aby zachodził związek między występowaniem polimorfizmu rs699947 a rozwojem AMD. Nasze obserwacje są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych z udziałem populacji holenderskiej, angloceltyckiej, hinduskiej oraz hiszpańskiej (17–21).

Dotychczasowe wyniki badań nad zależnością między polimorfizmem rs699947 *VEGF-A* a odpowiedzią na leczenie anti-angiogenne u chorych na AMD są niejednoznaczne. Część wyników badań dowodzi istnienia związku farmakogenetycznego między polimorfizmem rs699947 a wynikami leczenia. Przykładem mogą tu być wyniki obserwacji niektórych badaczy – np. Habibi i wsp. oraz Imai i wsp. wykazali, że osoby z genotypem AA lepiej reagowały na leczenie doszklistkowymi iniekcjami bewacyzumabu (22, 23). Podobne obserwacje poczynili Park i wsp. oraz Cruz-Gonzales i wsp., oni również odnotowali, że na leczenie lepiej reagowali chorzy z genotypem AA w polimorfizmie rs699947 *VEGF-A* (19, 24). Ciekawe spostrzeżenia zostały zawarte w metaanalizie obejmującej 8 publikacji dotyczących zależności między ośmioma najczęściej występującymi polimorfizmami *VEGF-A* (rs699946, rs699947, rs833069, rs833070, rs1413711, rs2010963, rs2146323) a odpowiedzią na leczenie doszklistkowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF (16). Wu i wsp.

wykazali, że genotyp AA rs699947 był związany z lepszą reakcją na leczenie, ale tylko w populacji azjatyckiej, u Europejczyków zaś takiej zależności nie stwierdzono (16). Zupełnie odmienne obserwacje poczynili Lazzeri i wsp. oraz Kitchens i wsp., którzy stwierdzili, że genotyp AA jest odpowiedzialny za brak pozytywnej reakcji na leczenie anti-VEGF (25, 26). Jeszcze inne spostrzeżenia poczynili badacze tureccy, którzy nie wykazali żadnego związku między odpowiedzią na leczenie a występowaniem polimorfizmu *VEGF-A* rs699947 u chorych na wysiękową postać AMD (27).

Wyniki metaanalizy pokazały, że spośród wszystkich badanych polimorfizmów genowych jedynie polimorfizm *VEGF-A* rs833061 był związany z pozytywną reakcją na leczenie anti-VEGF. Nasze badania, których wyniki przedstawiamy w tej pracy, nie obejmowały genotypowania tego polimorfizmu. Badacze podkreślają, że pozytywna reakcja na leczenie u chorych na wysiękową postać AMD z analizowanych populacji była prawdopodobnie związana ze zmniejszoną ekspresją czynnika *VEGF-A* u homozygot CC rs833061 (16).

U badanych przez nas chorych genotyp AA rs699947 nie miał żadnego wpływu na przebieg leczenia, korzystny wpływ natomiast miał genotyp CC rs2146323, a genotyp AC promował słabą odpowiedź na leczenie. Zbyt mała liczebność grup chorych z genotypem AA tego polimorfizmu uniemożliwiła przeprowadzenie analizy statystycznej dla tej klasy genotypowej. Pojedyncze doniesienia wskazują na istnienie zależności między polimorfizmem rs2146323 a rozwojem wysiękowej postaci AMD i jej przebiegiem klinicznym (28). Wyniki większości badań jednak nie potwierdzają tej obserwacji (29–31). Podobne spostrzeżenia przedstawili w swojej metaanalizie Wu i wsp., którzy m.in. wykazali, że wariant rs2146323 polimorfizmu *VEGF-A* nie miał wpływu na wyniki leczenia wszystkich chorych na AMD z analizowanych populacji ($p > 0,05$) (16). Hagstrom i wsp. u chorych uczestniczących w badaniu CATT (Comparison of AMD Treatments Trials), u których oceniano i analizowano

występowanie siedmiu polimorfizmów genu *VEGF-A* (rs699946, rs699947, rs833069, rs833070, rs1413711, rs2010963, rs2146323) oraz polimorfizmu *VEGFR-2* (rs2071559), nie stwierdzili farmakogenetycznego związku między ww. wariantami genów *VEGF-A* i *VEGFR-2* a wynikami leczenia (32). U chorych z naszej grupy badanych też nie wykazaliśmy związku między występowaniem polimorfizmu rs2146323 a rozwojem AMD. Wyniki naszych badań są zatem zbieżne z częścią opublikowanych wyników badań nad udziałem rs2146323 w mechanizmie rozwoju AMD. Należy również podkreślić, że AMD jest chorobą wieloczynnikową, o jej rozwoju i przebiegu decyduje nie jeden polimorfizm genowy, lecz zjawisko kumulacji efektów wielu alleli ryzyka rozwoju tego schorzenia.

Rozbieżności w wynikach badań mogą wynikać z różnej liczebności badanych grup, różnic w zaawansowaniu choroby w badanych populacjach, różnic w kryteriach oceny skuteczności leczenia, a przede wszystkim z różnic etnicznych badanych.

Ciekawym spostrzeżeniem przytaczanym w naszej pracy jest podobne występowanie polimorfizmów VEGFA rs699947 oraz VEGFA rs2146323 u badanych z grupy chorych na AMD oraz z grupy porównawczej, którą stanowili chorzy na zaćmę starczą. W dostępnej literaturze przedmiotu nie znaleźliśmy żadnej publikacji na temat oceny występowania polimorfizmów VEGFA u chorych na zaćmę, w przyszłości to zagadnienie może być ciekawym tematem dalszych badań.

Podsumowanie

Wyniki naszych obserwacji wykazały, że polimorfizmy rs2146323 i rs699947 genu *VEGF-A* nie mają wpływu na ryzyko zachorowania na AMD. Obecność polimorfizmu rs2146323 *VEGF-A* może modulować odpowiedź na leczenie doszkliskowymi iniekcjami czynnika anti-VEGF. Nasza praca ma pewne ograniczenia; oceniliśmy tylko dwa polimorfizmy genowe VEGF. Dlatego zamierzamy kontynuować nasze badania i rozszerzyć analizowane polimorfizmy genu *VEGF-A* o kolejne warianty.

Uważamy, że analiza wariantów genetycznych promujących rozwój AMD i mających wpływ na wyniki leczenia wysiękowej postaci AMD może być cennym narzędziem do wczesnego zidentyfikowania chorych „opornych” na terapię antyangiogenną.

Z powodu dużej rozbieżności wyników dotychczas przeprowadzonych badań klinicznych, wskazujących na zróżnicowany wpływ badanych polimorfizmów genowych czynnika VEGF-A na rozwój AMD oraz na rezultaty leczenia zależne od badanej grupy chorych, wskazane wydaje się stworzenie indywidualnego i swoistego dla danej populacji docelowej panelu badań genetycznych.

Praca powstała w ramach programu statutowego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum nr K/ZDS/006284.

Piśmiennictwo:

1. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med. 2003; 9(6): 669–676.
2. Barchitta M, Maugeri A: *Association between Vascular Endothelial Growth Factor Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration: An Updated Meta-Analysis*. Disease Markers. 2016; 2016, ID 8486406, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8486406>.

3. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME: *Vascular endothelial growth factor in eye disease*. Prog Retin Eye Res. 2008; 27(4): 331–371.
4. Grisanti S, Zhu Q, Tatar O, Lueke J, Lueke M, Tura A, et al.: *Differential expression of vascular endothelial growth factor-a isoforms in neovascular age-related macular degeneration*. Retina. 2015; 35(4): 764–772.
5. Martin DF, Maguire MG, Ying G, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ, et al.: *Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med. 2011; 364: 1897–1908.
6. Pożarowska D, Pożarowski P: *The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy*. Cent Eur J Immunol. 2016; 41(3): 311–316.
7. Krebs I, Glittenberg C, Ansari-Shahrezaei S, Hagen S, Steiner I, Binder S: *Non-responders to treatment with antagonists of vascular endothelial growth factor in age-related macular degeneration*. Br J Ophthalmol. 2013; 97(11): 1443–1446.
8. Sergejeva O, Botov R, Liutkeviciene R, Kriauciuniene L: *Genetic factors associated with the development of age-related macular degeneration*. Medicina. 2016; 52: 79–88.
9. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML: *Polymorphism in C2, CFB and C3 are associated with progression in advanced age-related macular degeneration associated with visual loss*. J Med Genet. 2009; 46: 300–307.
10. Akagi-Kurashige Y, Yamashiro K, Gotoh N, Miyake M, Morooka S, Yoshikawa M, et al.: *MMP20 and ARMS2/HTRA1 are associated with neovascular lesion size in age-related macular degeneration*. Ophthalmology. 2015; 12291: 2295–2301.
11. Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, et al.: *Seven new loci associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet. 2013; 45: 433–439.
12. Ferrara N: *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med. 1999; 77: 527–543.
13. Goncalves FM, Martins-Oliveira A, Speciali JG, Izidoro-Toledo TC, Luizon MR, Dach F, et al.: *Vascular endothelial growth factor genetic polymorphism and haplotypes in women with migraine DNA*. Cell Biol. 2010; 327: 357–362.
14. Pasqualetti G, Danesi R, Del Tacca M, Bocchi G: *Vascular endothelial growth factor pharmacogenetics a new perspective for anti-angiogenic therapy*. Pharmacogenomics. 2007; 8(1): 49–66.
15. Watson CL, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE: *Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene correlation with variation in VEGF protein production*. Cytokine. 2000; 12: 1232–1235.
16. Wu M, Xiong H, Xu Y, Xiong X, Zou H, Zheng M, et al.: *Association between VEGF-A and VEGFR-2 polymorphisms and response to treatment of neovascular AMD with anti-VEGF agents: a meta-analysis*. Br J Ophthalmol. 2016; 0:1–9. doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309418.
17. Boekhoorn SS, Isaacs A, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hoffman A: *Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and risk of age-related macular degeneration: the Rotterdam Study*. Ophthalmology. 2008; 115: 1899–1903.
18. Gupta D, Gupta V, Singh V, Prakash S, Agrawal S, Chawla S, et al.: *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and association with age related macular degeneration in Indian patients*. Meta Gene. 2016; 22(9): 249–253.

19. Cruz-Gonzalez F, Cabrillo-Estévez L, López-Valverde G, Cieza-Borrella C, Hernández-Galilea E, González-Sarmiento R: *Predictive value of VEGF A and VEGFR2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet AMD*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2014; 252(3): 469–475.
20. Cruz-González F, Cieza-Borrella C, Cabrillo-Estévez L, Cañete-Campos C, Escudero-Domínguez F, González-Sarmiento R: *VEGF A (rs699947 and rs833061) and VEGFR2 (rs2071559) gene polymorphisms are not associated with AMD susceptibility in a Spanish population*. Curr Eye Res. 2013; 38(12): 1274–1277.
21. Lin JM, Wan L, Tsai YY, Lin HJ, Tsai Y, Lee CC, et al.: *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol. 2008; 145(6): 1045–1051.
22. Habibi I, Sfar I, Chebil A, Kort F, Bouraoui R, Jendoubi-Ayed S, et al.: *Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration in Tunisian population*. Biomark Res. 2014 Aug 18; 2:15. doi: 10.1186/2050-7771-2-15.
23. Imai D, Mori K, Horie-Inoue K, Gehlbach PL, Awata T, Inoue S, et al.: *CFH, VEGF, and PEDF genotypes and the response to intravitreal injection of bevacizumab for the treatment of age-related macular degeneration*. J Ocul Biol Dis Infor. 2010; 3(2): 53–59.
24. Park UC, Shin IY, Kim SJ, Shin ES, Lee JE, McCarthy IC, et al.: *Genetic factors associated with response to intravitreal ranibizumab in Korean patients with neovascular age-related macular degeneration*. Retina. 2014; 34: 288–297.
25. Lazzeri S, Figus M, Orlandi P, Fioravanti A, Di Desidero T, Agosta E, et al.: *VEGF-A polymorphisms predict short-term functional response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration*. Pharmacogenomics. 2013; 14(6): 623–630.
26. Kitchens JW, Kassem N, Wood W, Stone TW, Isernhagen R, Wood E, et al.: *A pharmacogenetics study to predict outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration*. Clin Ophthalmol. 2013; 7: 1987–1993.
27. Kepez Yildiz K, Ozdek S, Ergun MA, Ergun S, Yaylacioglu Tuncay F, Elberg S: *CFH Y402H and VEGF polymorphisms and anti-VEGF treatment response in edudative age-related macular degeneration*. Ophthalmic Res. 2016; 56(3): 132–138.
28. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, et al.: *Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47(1): 329–335.
29. Bulgu Y, Cetin GO, Caner V, Cetin EN, Yaylali V, Yildirim C: *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration in a Turkish population*. Int J Ophthalmol. 2014; 18, 7(5): 773–777.
30. Churchill AJ, Carter JG, Lovell HC, Ramsden C, Turner SJ, Yeung A, et al.: *VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration*. Hum Mol Genet. 2006; 1, 15(19): 2955–2961.
31. Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley MA Jr.: *Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration*. Mol Vis. 2009; 10, 15: 2710–2719.
32. Hagstrom SA, Ying GS, Pauer GJ, Huang J, Maguire MG, Martin DF: *VEGF-A and VEGFR-2 Gene Polymorphisms and Response to Anti-VEGF Therapy in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT)*. JAMA Ophthalmol. 2014; 132(5): 521–527.

Praca wpłynęła do Redakcji 18.04.2017 r. (KO-00117-2017)
Zakwalifikowano do druku 07.06.2017 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
dr hab. n. med. Agnieszka Kubicka-Trząska
Klinika Okulistyki i Onkologii Okulistycznej UJ CM
ul. Kopernika 38
31-501 Kraków
email: akubicka@onet.pl