



УДК 617.7-007.681-021.3:617.741-004.1]-021.1
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-3-43-53>



Конституциональные факторы риска первичной открытоугольной глаукомы и катаракты у европеоидного населения России

Коненков В.И.¹, Шевченко А.В.¹, Прокофьев В.Ф.¹, Трунов А.Н.², Черных В.В.²

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН)
Россия, 630060 г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова», Новосибирский филиал
Россия, 630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

РЕЗЮМЕ

Цель: выявление эндогенных факторов риска развития глаукомы и катаракты по результатам сравнительного анализа характера распределения комплексных генетических признаков, включающих в себя варианты генов ряда цитокинов и рецепторов к ним, металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, входящих в геном пациентов.

Материалы и методы. Обследован 501 человек европеоидного происхождения. Все обследованные родились и проживали в сибирском регионе России, были разделены на три группы пациентов – с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) ($n = 99$), со старческой катарактой ($n = 100$), контрольная группа ($n = 302$) без офтальмопатологии. Генотипирование анализируемых полиморфных позиций осуществляли методами реал-тайм ПЦР с использованием интеркалирующего красителя SYBRGreen I, TaqMan зондов и методом рестриктоного анализа длин продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) – для разных полиморфных генов.

Результаты. Результаты исследования частот встречаемости анализируемых генетических признаков среди пациентов с ПОУГ относительно данных контрольной группы показали наличие комбинированных генетических признаков, частота выявления которых при ПОУГ высока и характеризуется двухзначными показателями отношения шансов, высокими значениями показателей специфичности 99–100% и высокими значениями величины диагностического коэффициента. Прямое сравнение характера распределения двух ансамблей генов, белковые продукты которых участвуют в процессах ремоделирования внеклеточного матрикса, выявило значительное количество генетических признаков, характерных как для одного, так и для другого заболевания, что свидетельствует о значительных различиях в реализации генетической предрасположенности к их развитию.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности разработки достоверных лабораторных критериев (рискометров) прогноза предрасположенности к развитию ПОУГ и ранней диагностики на стадии доклинических проявлений.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, катаракта, внеклеточный матрикс, TGFB1 – TGFB2, MMP – TIMP, иммуногенетика

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование проводилось в рамках государственного задания НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0009 (регистрационный номер 122022800132-1) и НМИЦ «МНТК "Ми-

✉ Шевченко Алла Владимировна, shalla64@mail.ru

крохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова) «Разработка комплексной системы диагностики и мониторинга больных первичной открытоугольной глаукомы с оценкой состояния зрительных функций и эффективности лечения (медикаментозное, лазерное, хирургическое)» (регистрационный номер № 121072800028-3).

Соответствие принципам этики. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение операции, забор крови, а также использование данных исследования в научных целях. Исследование одобрено этическим комитетом НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН (протокол № 177 от 02.02.2003) и комитетом по биомедицинской этике Новосибирского филиала НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» (протокол № 2 от 2.09.2018).

Для цитирования: Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Трунов А.Н., Черных В.В. Конституциональные факторы риска первичной открытоугольной глаукомы и катаракты у европеоидного населения России. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(3):43–53. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-3-43-53>.

Constitutional risk factors for the development of glaucoma and cataracts in the Europioid population of Russia

Konenkov V.I.¹, Shevchenko A.V.¹, Prokofiev V.F.¹, Trunov A.N.², Chernykh V.V.²,

¹ *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – a branch of the Federal Research Center “Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”*

2, Timakova Str., Novosibirsk, 630060, Russian Federation

² *S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk branch*

10, Kolkhidskaya Str., Novosibirsk, 630096, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To identify endogenous risk factors for the development of glaucoma and cataracts based on the results of a comparative analysis of the nature of complex genetic trait distribution, including variants of genes for a number of cytokines and receptors for them, metalloproteinases, and their tissue inhibitors included in the genome of patients.

Materials and methods. The study included 501 people of the Caucasian race born and living in the Siberian region of Russia. They were divided into three groups of patients – patients with primary open-angle glaucoma (POAG) ($n = 99$), patients with senile cataract ($n = 100$), and the control group ($n = 302$) without ophthalmic pathology. Genotyping of the analyzed polymorphic loci was carried out by real-time PCR using the SYBRGreen I dye and TaqMan probes and by restriction fragment length polymorphism (RFLP) for different polymorphisms.

Results. The results of the study on the frequency of the analyzed genetic traits among patients with POAG compared to the control group showed the presence of combined genetic traits. The frequency of their detection in POAG was high and characterized by the two-digit value of the odds ratio, high values of specificity (99–100%), and high diagnostic coefficient. A direct comparison of the distribution of two ensembles of genes which protein products are involved in the extracellular matrix remodeling revealed a significant number of genetic traits characteristic of both diseases. This indicates significant differences in the implementation of the genetic predisposition to their development.

Conclusion. The data obtained indicate the possibility of developing reliable laboratory criteria (riskometers) for predicting predisposition to the development of POAG and early diagnosis at the stage of preclinical manifestations.

Keywords: primary open-angle glaucoma, cataract, extracellular matrix, TGFB1 – TGFB2, MMP – TIMP, immunogenetics

Source of financing. The study was carried out within the state assignment of the Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – a branch of the Federal Research Center “Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences” FWNR-2022-0009 (registration number 122022800132-1) and S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution “Developing a complex system for diagnosing and monitoring patients with primary open-angle glaucoma with the assessment of visual functions and treatment efficacy (drug therapy, laser and surgical treatment) (registration 121072800028-3).

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to surgery, blood sampling, and the use of research data for scientific purposes. The study was approved by the Ethics Committee at the Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology (Protocol No. 177 of 02.02.2003) and the Bioethics Committee at the Novosibirsk branch of S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution (Protocol No. 2 of 2.09.2018).

For citation: Kononkov V.I., Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Chernykh V.V., Trunov A.N. Constitutional risk factors for the development of glaucoma and cataracts in the European population of Russia. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(3):43–53. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-3-43-53>.

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой хорошо организованные трехмерные архитектурные сети, играющие важную структурную и функциональную роль в организации и ремоделировании тканей, а также в регуляции клеточных процессов [1]. Строительными блоками этих ультраструктур являются коллагены, протеогликаны и гликозаминогликаны, эластин и эластические волокна, ламинины, фибронектин и другие белки/гликопротеины [2]. ВКМ осуществляет коммуникационные связи между клетками в органах и тканях, координируя множественные команды передачи внутриклеточных и межклеточных сигналов. Как следствие, ВКМ влияет на морфогенез, развитие и гомеостаз тканей посредством регуляции клеточной физиологии, роста, пролиферации, дифференцировки и адгезии. ВКМ подвергаются интенсивному ремоделированию во время патологических состояний, играя ключевую роль в прогрессировании многих заболеваний, включая и заболевания органов зрения [3, 4].

Как и большинство сложно организованных физиологических систем, функциональное состояние ВКМ во многом определяется генетическими факторами, важнейшими из которых являются структуры полиморфных участков регуляторных областей генов как ультраструктурных компонентов матрикса, так и гуморальных факторов, влияющих на его активность (факторы роста, цитокины, хемокины, матриксные металлопротеиназы, их тканевые ингибиторы и т.п.). Сочетания структурных вариантов регуляторных участков этих генов, расположенных, как правило, в промоторных областях, определяют интенсивность экспрессии белковых продуктов и уровень их синтеза клетками-продуцентами [5]. Эти параметры определяют понятие «локусы количественных признаков», привлекающих все большее внимание исследователей в области медицинской генетики [6]. Учитывая полигенный характер генетической предрасположенности человека к развитию большинства заболеваний, наибольший интерес

представляют исследования ассоциированности патологических процессов не столько с единичными кандидатными генами, сколько с функционально связанными комплексами полиморфных генотипов.

Цель исследования: выявление эндогенных факторов риска развития глаукомы и катаракты по результатам сравнительного анализа характера распределения комплексных генетических признаков, включающих в себя варианты генов ряда цитокинов и рецепторов к ним, металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, входящих в геном пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», Федеральным законом Российской Федерации от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», а также требованиями Федерального закона от 27.07.2006 № 152-ФЗ (ред. от 21.07.2014) «О персональных данных» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.09.2015). В исследование включен 501 человек европейского происхождения, родившийся и проживающий в Сибирском федеральном округе России.

Обследуемые на основании данных проведенного офтальмологического исследования (определение остроты зрения, бинокулярная офтальмоскопия, сферопериметрия, эхоофтальмография, оптическая когерентная томография, определение внутриглазного давления (ВГД)) были разделены на три группы. Первая группа – 99 пациентов с верифицированным диагнозом II (развитой) стадии первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) (код МКБ-10 – H40.1). Количество пациентов мужского пола в группе составило 52 человека (52,53%), женского пола – 47 человек (47,47%). Средний возраст пациентов обследованной группы составлял $62,8 \pm 4,3$ года.

Вторую группу составили 100 человек с диагностированной старческой (неосложненной) катарактой (код МКБ-10 – H25). Количество пациентов

женского пола в группе составило 81 (81%) человек, мужского – 19 (19%) человек. Средний возраст пациентов обследованной группы составлял $63,5 \pm 0,4$ лет. Критериями исключения из обеих тестируемых групп являлось наличие у пациентов воспалительных заболеваний глаза, диабетической ретинопатии, глаукомы неоваскулярного типа, увеитов, гемофтальма, верифицированных аутоиммунных и опухолевых процессов в организме, а также сахарного диабета без офтальмологических осложнений. Контрольная группа (аналогичная по возрасту и этническому составу группам 1 и 2) – 302 человека, не имеющих признаков заболеваний органов зрения.

Иммуногенетическое обследование все пациенты прошли в лаборатории клинической иммуногенетики НИИКЭЛ – филиала ИЦИГ СО РАН. Генотипирование осуществляли методами ПЦР в реальном времени с использованием тест-систем с красителем SYBRGreen I (Литех, Россия) для rs1800629, rs361525, rs1800630, rs1143627, rs2243250, rs1800872, rs1800896; TaqMan зондов – для rs1800795, rs243865, rs3918242 (Синтол, Россия); методом рестриктоного анализа длин продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) – для rs4073 [7], rs4898 [8], rs8179090 [9], rs3025058 [10], rs1800469 [11], Gene ID 7046, D50683, L07594 [12].

Группа сравнения проанализирована по 11 полиморфным позициям. Пациенты с глаукомой и катарактой дополнительно исследованы по 8 следующим позициям генов цитокинов: *IL8-A251T* (rs4073), *IL17A-A197G* (rs227593), *TGFB-C509T* (rs1800469), генам рецепторов *TGFBRI*, *TGFBR II*, *TGFBR III* (Gene ID 7046, D50683, L07594 соответственно), генам ингибиторов металлопротеиназ *TIMP1-C372T* (rs4898), *TIMP2-G418C* (rs8179090).

При статистическом анализе результатов генетических исследований рассчитывали частоту встречаемости аллелей и генотипов и их комбинаций, отношение шансов (odds ratio – OR) и 95%-й доверительный интервал для OR (95% confidence interval – OR_CI95) [13]. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди – Вайнберга.

Для оценки полученных результатов, кроме общепринятых методов статистической обработки, использованы вычислительные методы биоинформатики, основанные на теории распознавания образов с вероятностным подходом, основанные на формуле Байеса (теорема об обратной вероятности или теорема гипотез) и модифицированном методе последовательного статистического анализа Вальда – неоднородной последовательной процедуре распознавания образов, которая позволяет определить диагности-

ческую ценность признаков путем вычисления диагностических коэффициентов (DK) [14]. Диагностический коэффициент – это десятичный логарифм отношений сглаженных частностей, умноженный на 10. DK представляют собой положительные или отрицательные числа. При этом чем больше величина диагностического коэффициента, тем больше дифференциально-диагностической информации он несет. Диагностические коэффициенты каждого найденного генетического признака суммируются, и при достижении предельных значений (порога) устанавливается вероятность наличия или отсутствия одного из альтернативных заболеваний (состояний).

При расчете интегральной характеристики генетических признаков в качестве диагностических и прогностических критериев, кроме расчета диагностического коэффициента, рассчитывали и величину специфичности биомаркера (Sp), – как вероятности истинно отрицательной пропорции [15].

Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по двустороннему критерию точного метода Фишера для четырехпольных таблиц. Статистическая обработка проводилась с помощью программы IBM SPSS Statistics 23 (США). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,01. Критическое значение уровня значимости при множественных сравнениях принималось с учетом поправки Бонферрони [16, 17].

РЕЗУЛЬТАТЫ

По 11 полиморфным позициям проведено сопоставление характера распределения единичных и комплексных генетических признаков в группах пациентов с ПОУГ и катарактой с аналогичными данными референсной группы здоровых лиц без признаков заболеваний органов зрения (табл. 1).

Таблица 1

Полиморфные позиции исследованных генов в группах пациентов с ПОУГ, катарактой, и лиц без офтальмопатологии				
	Показатель	Поли-морфная позиция	Локализация (хромосома)	N референсного сиквенса
Гены цитокинов				
1	<i>TNFA</i>	-238 G/A	6q21.3	rs361525
2	<i>TNFA</i>	-308 G/A	6q21.3	rs1800629
3	<i>TNFA</i>	-863 C/A	6q21.3	rs1800630
4	<i>IL1B</i>	-31 C/T	2q14.2	rs1143627
5	<i>IL4</i>	-590 C/T	5q31.1	rs2243250
6	<i>IL6</i>	-174 G/C	7p21	rs1800795
7	<i>IL10</i>	-592 C/A	1q31–q32	rs1800872
8	<i>IL10</i>	-1082 A/G	1q31–32	rs1800896

Окончание табл. 1

Показатель	Поли-морфная позиция	Локализация (хромосома)	№ референсного сиквенса	
Гены металлопротеиназ				
9	<i>MMP2</i>	-1306 С/Т	16q12.2	rs243865
10	<i>MMP3</i>	-1171 5А/6А	11q22.3	rs3025058
11	<i>MMP9</i>	-1562 С/Т	20q13	rs3918242

Результаты исследования группы пациентов с ПОУГ представлены в табл. 2. При первичном анализе достоверности различий между группами здоровых лиц и пациентов с глаукомой, с применением двухстороннего критерия точного метода Фишера, были выявлены признаки, частота которых достоверно различалась как в сторону увеличения, так и в сторону снижения частоты в группе пациентов с ПОУГ с уровнем достоверности различий $p < 0,01$.

С целью получения более достоверных значений, результаты которых могут быть транслированы в клиническую практику для разработки дополнительных лабораторных ранних диагностических и прогностических критериев, нами было применено использование поправки Бонферрони. Это способ устранения эффекта множественных сравнений, возникающего при необходимости построения семейства статистических выводов, что позволяет избежать ложных заключений о наличии различий между группами, тогда как на самом деле верна нулевая гипотеза об отсутствии различий. Применение данного подхода позволило отобрать признаки, частота которых наиболее достоверно различается в группе пациентов с ПОУГ от распределения аналогичных генетических признаков в достаточно значимой группе здоровых лиц при сохранении заданного уровня достоверности различий $p < 0,01$.

В составе комплексных генетических признаков, частота которых значимо изменена среди пациентов с ПОУГ, выявляются как варианты генов цитокинов с провоспалительной и противовоспалительной активностью, так и варианты генов матричных металлопротеиназ. Среди генов цитокинов в составе этих признаков наиболее часто выявляются варианты гена *TNFA* и *IL10*, а среди генов металлопротеиназ – варианты гена *MMP2*. Варианты генов *IL1B* и *MMP3* не вошли ни в один из достоверно различающийся по частоте встречаемости комплексов в группах. Сами признаки носят сложный характер и включают в себя от двух до шести локусов, различно сочетающихся и ассоциированных с различным уровнем экспрессии генов.

Среди наиболее тесно ассоциированных с развитием ПОУГ комплексных генетических признаков выделяются комплексы *IL6-174:*

IL4-590:IL10-592:MMP2-1306: MMP9-1562, TNF-238:IL6-174:IL4-590:IL10-592:MMP2-1306, TNF-308:IL6-174:IL4-590:IL10-592:MMP2-1306 и TNF-308:IL4-590, TNF-308:TNF-238, прогностический вес которых, согласно величине диагностического коэффициента, превышает значение 11,0, что соответствует достоверности прогностического заключения свыше 95%. Практически не выявлены среди пациентов с ПОУГ комбинированные генетические признаки: *TNF-238:IL4-590:IL10-1082, IL10-1082:MMP2-1306:MMP9-1562 и TNF-308:IL10-1082:MMP2-1306*, что свидетельствует об их вероятной протективной значимости.

Формально сходные, но альтернативные по содержанию результаты получены нами при сравнительном анализе частот встречаемости генетических признаков в группах пациентов с катарактой и среди здоровых лиц. Так анализ достоверности различий по двухстороннему точному методу Фишера также выявил значительную группу признаков из 844 значений. Применение подхода с использованием поправки Бонферрони, как способа устранения эффекта множественных сравнений, позволило отобрать признаки, частота которых наиболее достоверно различается в группе пациентов с катарактой от распределения аналогичных генетических признаков в контрольной группе при сохранении заданного уровня достоверности различий $p < 0,01$. Среди комплексных генетических признаков, ассоциированных с развитием катаракты, преобладают признаки, содержащие различные варианты гена *TNF* во всех трех исследованных позициях. Однако преобладающим вариантом являются варианты А или АА в позиции –308, ассоциированные с повышенной способностью клеток к продукции этого провоспалительного цитокина (табл. 3). В этой группе пациентов установлена большая доля генетических признаков, тесно ассоциированных с развитием заболевания. Так, из признаков, частота которых достоверно повышена при катаракте, 12 характеризуются двузначной величиной диагностического коэффициента, показателем специфичности признака 99–100% и двузначной величиной показателя отношения шансов.

Максимальным прогностическим весом обладают признаки: *TNF-308:TNF-238, TNF-863:TNF-308:TNF-238, TNF-308:TNF-238:MMP9-1562, TNF-308:IL6-174, TNF-308:IL1B-31, TNF-308:TNF-238:IL6-174 и TNF-308:TNF-238:IL1B-31*. При этом в их состав во всех случаях входит гомозиготный вариант *TNFA-308 AA*. Выявлены и комбинированные генетические признаки с высокой протективной значимостью: *IL6-174:IL4-590:IL10-1082 и TNF-863:IL6-174:IL10-1082*.

Получение данных о сходстве и различиях в характере распределения единичных и комплексных генетических признаков среди пациентов с ПОУГ и катарактой побудило нас более подробно исследовать эти результаты. В сравнительный анализ характера распределения генетических признаков в обеих группах пациентов были добавлены варианты генов *IL17A* -197A/G, гена *TGFB* -509C/T и гена *IL8*

-251A/T в связи с данными об активном участии их белковых продуктов в регуляции воспалительных процессов и в ремоделировании внеклеточного матрикса; генов тканевых ингибиторов металлопротеиназы *TIMP1* -372C/T, *TIMP2* -418G/C, составляющими с MMP единый регуляторный комплекс, и генов рецепторов к TGFB: *TGFBRI*, *TGFBRII* и *TGFBRIII* (табл. 4).

Таблица 2

Частота распределения анализируемых генетических признаков в группах пациентов с глаукомой и здоровых лиц								
Полиморфная позиция	Аллели/Генотипы	ПОУГ, %	Контроль, %	OR	OR_CI95	Sp	DK	P_cor
TNF-308	AA	7,07	0,66	11,41	2,33–55,90	99,34	10,3	0,0033
TNF-308:TNF-238	AA-GG	6,06	0,34	18,84	2,24–158,50	99,66	12,5	0,0091
TNF-308:IL4-590	AA-CC	7,07	0,34	22,37	2,72–184,21	99,66	13,2	0,0024
IL10-592:MMP2-1306	CA-TC	26,26	7,89	4,16	2,15–8,02	92,11	5,2	0,0008
TNF-308:IL10-592:MMP2-1306	GG-CA-TC	19,19	5,70	3,93	1,85–8,32	94,30	5,3	0,0080
TNF-238:IL10-592:MMP2-1306	GG-CA-TC	24,24	7,05	4,22	2,13–8,37	92,95	5,4	0,0015
IL6-174:IL10-592:MMP2-1306	GC-CA-TC	17,35	3,07	6,63	2,65–16,57	96,93	7,5	0,0023
IL4-590:IL10-592:MMP2-1306	CC-CA-TC	17,17	3,51	5,70	2,37–13,71	96,49	6,9	0,0022
TNF-308:IL6-174:IL10-592:MMP2-1306	GG-GC-CA-TC	14,29	2,63	6,17	2,29–16,58	97,37	7,3	0,0092
TNF-238:IL6-174:IL10-592:MMP2-1306	GG-GC-CA-TC	16,33	3,08	6,13	2,43–15,44	96,92	7,2	0,0038
IL6-174:IL4-590:IL10-592:MMP2-1306	GC-CC-CA-TC	12,24	0,88	15,77	3,46–71,91	99,12	11,4	0,0053
IL6-174:IL10-592:MMP2-1306:MMP9-1562	GC-CA-TC-CC	13,27	2,22	6,73	2,33–19,45	97,78	7,8	0,0098
TNF-238:IL6-174:IL4-590:IL10-592:MMP2-1306	GG-GC-CC-CA-TC	11,22	0,88	14,22	3,09–65,48	99,12	11,1	0,0073
IL6-174:IL4-590:IL10-592:MMP2-1306:MMP9-1562	GC-CC-CA-TC-CC	11,22	0,44	28,32	3,60–222,67	99,56	14,0	0,0090

Примечание (для всех таблиц). P_cor – скорректированное значение *p* двустороннего точного критерия Фишера (поправка Бонферрони).

Таблица 3

Частота распределения анализируемых генетических признаков в группах пациентов с катарактой и здоровых лиц								
Полиморфная позиция	Аллели/Генотипы	Катаракта, %	Контроль, %	OR	OR_CI95	Sp	DK	P_cor
IL1B-31	T	50,50	64,46	0,56	0,41–0,78	49,50	-1,1	0,0012
IL1B-31	C	49,50	35,54	1,78	1,28–2,46	64,46	1,4	0,0012
TNF-308	AA	12,00	0,66	20,45	4,49–93,12	99,34	12,6	0,0003
IL1B-31	CC	28,00	13,59	2,47	1,42–4,29	86,41	3,1	0,0057
TNF-863:TNF-308	CC-AA	11,00	0,67	18,42	4,01–84,64	99,33	12,2	0,0007
TNF-863:MMP2-1306	CA-TT	9,00	0,87	11,32	2,40–53,42	99,13	10,2	0,0045
TNF-308:TNF-238	AA-GG	12,00	0,34	39,82	5,11–310,52	99,66	15,5	0,0007
TNF-308:IL1B-31	AA-TC	7,00	0,35	21,53	2,61–177,27	99,65	13,0	0,0036
TNF-308:IL6-174	AA-GC	6,00	0,00	21,81	2,65–179,55	100,00	15,8	0,0018
TNF-308:MMP9-1562	AA-CC	8,00	0,71	12,09	2,52–57,94	99,29	10,5	0,0040
IL6-174:IL10-1082	GC-GG	3,00	16,47	0,16	0,05–0,53	97,00	-7,4	0,0054
TNF-863:TNF-308:TNF-238	CC-AA-GG	11,00	0,34	36,09	4,60–283,40	99,66	15,1	0,0013
TNF-863:IL6-174:IL10-1082	CC-GC-GG	1,00	12,35	0,07	0,01–0,54	99,00	-10,9	0,0088
TNF-863:MMP2-1306:MMP9-1562	CA-TT-CC	8,00	0,44	19,65	2,42–159,36	99,56	12,6	0,0088
TNF-308:TNF-238:IL1B-31	AA-GG-TC	7,00	0,36	21,08	2,56–173,56	99,64	12,9	0,0085
TNF-308:TNF-238:IL6-174	AA-GG-GC	6,00	0,00	21,29	2,59–175,31	100,00	15,7	0,0054
TNF-308:TNF-238:MMP9-1562	AA-GG-CC	8,00	0,36	23,91	2,95–193,77	99,64	13,4	0,0013
IL6-174:IL4-590:IL10-1082	GC-CC-GG	0,00	10,06	0,08	0,01–0,64	100,00	-13,2	0,0100

Частота распределения анализируемых генетических признаков в группах пациентов с глаукомой и катарактой

Полиморфная позиция	Аллели/Генотипы	ПОУГ, %	Катаракта, %	OR	OR_CI95	Sp	DK	P_cor
IL1B-31	T	64,65	50,50	1,79	1,20–2,68	49,50	1,1	0,0092
IL1B-31	C	35,35	49,50	0,56	0,37–0,83	64,65	–1,5	0,0092
TGFBR2	C	98,48	91,50	6,04	1,74–20,95	8,50	0,3	0,0040
TGFBR2	G	1,52	8,50	0,17	0,05–0,57	98,48	–7,5	0,0040
TGFBR2	CC	96,97	84,00	6,10	1,72–21,65	16,00	0,6	0,0084
IL1B-31:MMP2-1306	TT-TC	22,22	5,00	5,43	1,96–15,00	95,00	6,5	0,0036
TNF-238:IL1B-31:MMP2-1306	GG-TT-TC	22,22	5,00	5,43	1,96–15,00	95,00	6,5	0,0072
IL8-251:IL17-197:MMP9-1562	TA-GG-CC	21,21	4,08	6,33	2,08–19,21	95,92	7,2	0,0088
TNF-863:TNF-238: IL1B-31:IL4-590	CC-GG-CC-CC	1,01	16,00	0,05	0,01–0,41	98,99	–12,0	0,0060
TNF-863:TNF-238: IL1B-31:TIMP2-418	CC-GG-CC-GG	4,04	21,00	0,16	0,05–0,48	95,96	–7,2	0,0092
TNF-308:IL6-174: IL17-197:MMP2-1306	GG-GC-GG-TC	15,31	1,00	17,89	2,31–138,31	99,00	11,8	0,0051
IL6-174:IL17-197: MMP2-1306:TGFBR2	GC-GG-TC-CC	15,31	1,00	17,89	2,31–138,31	99,00	11,8	0,0037
IL8-251:IL17-197: MMP9-1562:TGFBR2	TA-GG-CC-CC	20,20	3,06	8,02	2,30–27,97	96,94	8,2	0,0066
TNF-308:IL6-174:IL17-197: MMP2-1306:TIMP2-418	GG-GC-GG-TC-GG	15,31	1,00	17,89	2,31–138,31	99,00	11,8	0,0060
TNF-308:IL6-174:IL17-197: MMP2-1306:TGFBR2	GG-GC-GG-TC-CC	14,29	0,00	17,82	2,31–137,72	100,00	14,7	0,0000
IL6-174:IL17-197:M- MMP2-1306:TIMP2-418:TGFBR2	GC-GG-TC-GG-CC	15,31	1,00	17,89	2,31–138,31	99,00	11,8	0,0047
TNF-308:IL6-174:IL10-592: IL17-197:TIMP2-418:TGFBR2	GG-GC-CA-GG-GG-CC	13,27	0,00	16,44	2,12–127,60	100,00	14,4	0,0067
TNF-308:IL6-174:IL17-197:M- MMP2-1306:TIMP2-418:TGFBR2	GG-GC-GG-TC-GG-CC	14,29	0,00	17,82	2,31–137,72	100,00	14,7	0,0000

При анализе этих результатов обращают на себя внимание три основных момента. Во-первых, с применением поправки Бонферрони с заданным уровнем достоверности различий $p < 0,01$ значительно, по сравнению с группой здоровых лиц, возрастает число достоверно различающихся по частоте генетических признаков. Во-вторых, в состав комбинированных генетических признаков входит большое число вариантов вновь включенных в анализ генов, что подтверждает правильность их включения в исследование. В-третьих, значительно возрастает число высоко достоверно различающихся признаков, что повышает их прогностическую значимость. В целях отбора анализируемых генетических признаков, пригодных для возможного трансляционного применения в клинической практике, мы в пять раз повысили уровень значимости достоверности различий: с 0,05 до 0,01.

При анализе полученных результатов вновь обращает на себя внимание преимущественное участие вариантов генов *TNFA* в формировании комплексных генетических признаков, дифференцирующих сопоставляемые заболевания. Результаты проведенного исследования показали достоверное возраста-

ние частоты аллеля T гена *IL1B* в точке полиморфизма -31C/T в группе пациентов с ПОУГ ($p = 0,0046$), тогда как в исследовании пациентов балканского населения была показана протективная роль другого варианта гена *IL1B* -rs16944 в развитии этого заболевания [18]. Еще более значимые различия между группами обследованных лиц установлены при исследовании распределения вариантов гена рецептора *TGFR2* 2-го типа. Вариант D50683 C выявлен более чем у 98% пациентов с ПОУГ, что значительно чаще, чем у пациентов с катарактой ($OR = 6,04$; $p = 0,002$).

Та же закономерность выявляется и для гомозиготного генотипа CC этого варианта гена рецептора к *TGFB*. К настоящему моменту нет данных о влиянии полиморфизма гена рецептора *TGFR2* 2-го типа на экспрессию его белковых продуктов, однако имеющиеся данные о значительном повышении содержания белка TGFβ2RII в трабекулярной сети пациентов с глаукомой позволяют предположить наличие такой связи в развитии фибротических процессов при ПОУГ [19]. Значительные изменения концентраций изоформ TGFβ во внутриглазной жидкости пациентов с ПОУГ описаны нами ранее [20].

Сопоставление характера распределения вариантов генов, участвующих в ремоделировании ВКМ, выявило значительные различия между группами пациентов. Возрастает число генетических признаков, наличие которых в геноме пациента достоверно ассоциировано с развитием ПОУГ, что характеризуется двухзначными значениями показателя OR в интервале от 16,44 до 17,89; показателями диагностического коэффициента до 14,7 и значениями показателя специфичности 99–100%. Двенадцать таких комбинированных генетических признаков представлены в табл. 4. Там же представлены генетические признаки, частота которых значительно повышена в группе пациентов с катарактой. Полученные в цифровом формате данные представлены на рисунке. В графической диаграмме – закономерности распределения частот изученных генетических признаков при обоих заболеваниях.

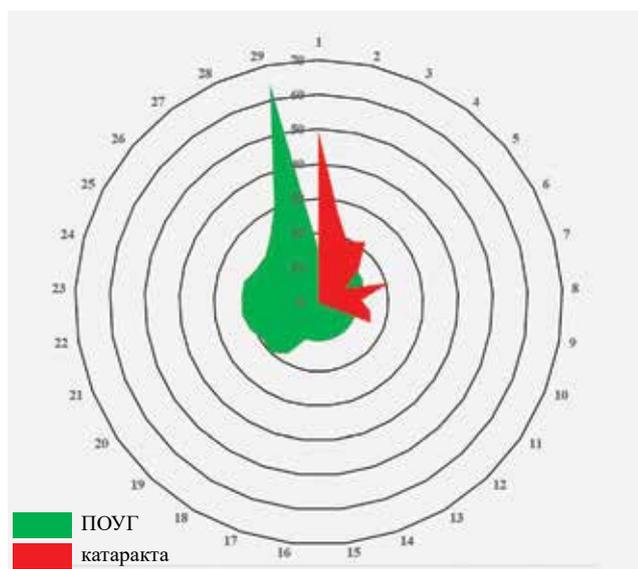


Рисунок. Распределения частот полиморфных вариантов исследованных генов при ПОУГ и катаракте: номера и масштаб радиальных осей соответствуют числовым значениям табл. 4

Хорошо видны выраженные различия в частотах встречаемости комбинированных генетических признаков, хотя в центральной части рисунка отмечается зона повторяющихся комбинаций, что, вероятно, отражает наличие общих звеньев патогенеза заболеваний глаз, связанных с воспалением, фиброзом и ремоделированием ВКМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ характера распределения вариантов полиморфных участков генов среди пациентов с ПОУГ мы начали с сопоставления с аналогичными данными

ми в основной контрольной группе, которая представлена 302 индивидами европеоидного происхождения, родившихся и постоянно проживающих в РФ. Результаты проведенного исследования показали значительное число отклонений в характере распределения исследуемых признаков как для ряда вариантов полиморфных участков отдельных генов, так и для их комбинаций. Анализ распределения единичных SNP выявил возрастание среди пациентов с ПОУГ вариантов А гена *IL10* в позициях -1082 и -592 при соответствующим относительным снижением альтернативных вариантов G и C, что подтверждается и изменениями в частотах соответствующих генотипов. Полиморфизм -1082G/A, идентифицированный в области промотора *IL-10*, связан с более высокой продукцией IL-10, при наличии G аллельного варианта относительно А аллельного варианта в том же положении [21]. Эти данные могут косвенно свидетельствовать о том, что среди пациентов с ПОУГ с большей частотой встречаются аллели гена *IL-10*, связанные с низкой продукцией соответствующего цитокина с противовоспалительной активностью IL-10, синтезируемым Th2-клетками и подавляющим продукцию цитокинов Th1-клетками.

Обращает на себя внимание и тот факт, что в состав тесно ассоциированных с ПОУГ комплексных генетических признаков, как правило, входят варианты генов как с провоспалительной, так и с противовоспалительной активностью.

Анализ полученных данных показал, что среди пациентов с катарактой повышена частота встречаемости аллеля А и генотипа АА гена *TNF* в точке полиморфизма -308. Ранее было показано, что вариант А ассоциирован с повышенным уровнем продукции этого провоспалительного цитокина [22]. Имеются лишь единичные данные метаанализа о невысокой степени ассоциированности развития ПОУГ с аллелем А и генотипом АА варианта гена *TNFA308G/A* (OR в интервале 1,6–1,7) более выраженной у монголоидов. Ни один из других полиморфизмов не был значимо связан с риском ПОУГ [23].

В нашем исследовании также не было установлено изолированной ассоциированности ни одного из трех исследованных полиморфных вариантов этого гена с ПОУГ или с катарактой, однако в составе достоверно ассоциированных комплексных генетических признаков различные генотипы этого гена выявлены неоднократно. В отличие от группы пациенты с ПОУГ, среди пациентов с катарактой отмечается повышение частоты встречаемости варианта С и гомозиготного генотипа СС гена *ILB1-31*. Так же, как и в группе пациентов с ПОУГ, выявлено повышение частоты встречаемости вариантов А гена

IL10 в позиции -1082 при соответствующим относительным снижением альтернативных вариантов *G*, что свидетельствует о распространении среди пациентов с катарактой варианта, связанного с низкой способностью клеток к продукции *IL-10*.

Добавленные в анализ сравнения между группами пациентов с различными глазными болезнями варианты генов цитокинов *IL17A-197 A/G*, *TGFB C/T* и *IL8-251 A/T*; генов тканевых ингибиторов металлопротеиназ *TIMP1-372 C/T*, *TIMP2-418 G/C*, составляющими с *MMP* единый регуляторный комплекс, и генов рецепторов к *TGFB*: *TGFBRI*, *TGFBR II* и *TGFBR III* более полно характеризуют состояние ВКМ при сопоставляемых заболеваниях.

Белковые продукты этих генов участвуют в процессах жизнедеятельности клеток-продуцентов структурных элементов ВКМ, в регуляции эластичности, рыхлости или жесткости матрикса, в процессах ангиогенеза и лимфангиогенеза, обмене тканевой жидкости, в гомеостатичности ее состава, клеточной миграции, апоптоза и т.д. Практически в анализ входят два ансамбля генов – гены цитокинов и рецепторов к ним, а также гены металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов. Наряду с возможным практическим применением полученных результатов в прогностических целях, сопоставление характера распределения вариантов генов, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса, имеет и фундаментальное значение, позволяя вывить общие и специфические признаки реализации генетической предрасположенности к развитию заболеваний глаз различного генеза.

Хотя до сих пор анализируемые в этом сообщении гены лишь частично включались в состав генов ремоделирования тканевых структур глаза человека при глаукоме [24]. Нам представляется, что высокая степень ассоциированности комплексов их вариантов с заболеваниями глаз различного генеза делает их анализ перспективным в дальнейших исследованиях. Ранее была показана ассоциированность ПОУГ с отдельными вариантами полиморфных участков генов *TIMP* среди монголоидов [25] и генов *MMP-TIMP* среди европеоидов [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ результатов исследования частот встречаемости анализируемых генетических признаков, включающих в себя варианты генов цитокинов и металлопротеиназ, среди пациентов с ПОУГ в сравнении с данными по контрольной группе здоровых лиц показал наличие группы комбинированных генетических признаков, частота выявления которых среди пациентов чрезвычайно высока,

что характеризуется двухзначными показателями отношения шансов *OR*, высокими значениями показателей специфичности 99–100% и высокими значениями величины диагностического коэффициента.

Альтернативные по содержанию результаты, получены нами при сравнительном анализе частот встречаемости изучаемых генетических признаков в группах пациентов с катарактой и среди здоровых лиц. Применение подхода с использованием поправки Бонферрони, как способа устранения эффекта множественных сравнений, позволило отобрать признаки, частота которых наиболее достоверно различается в группе пациентов с катарактой от распределения аналогичных генетических признаков в группе 302 здоровых лиц при сохранении заданного уровня достоверности различий $p < 0,01$.

Прямое сравнение характера распределения двух ансамблей генов, белковые продукты которых участвуют в процессах ремоделирования ВКМ, – генов цитокинов и рецепторов к некоторым из них (*TGFB1* – *TGFB2*), а также генов металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов (*MMP* – *TIMP*), выявило значительное количество генетических признаков, характерных как для одного, так и для другого заболевания, что свидетельствует о значительных различиях в реализации генетической предрасположенности к их развитию.

Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности разработки на этой основе достоверных лабораторных критериев (рискометров) раннего диагноза и прогноза предрасположенности к развитию ПОУГ и катаракты до развития клинических и инструментальных признаков заболевания в молодом возрасте.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Urbanczyk M., Layland Sh., Schenke-Layland K. The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. *Matrix Biol.* 2020;85–86:1–14. DOI: 10.1016/j.matbio.2019.11.005.
2. Petridou N.I., Spiró Z., Heisenberg C.-P. Multiscale force sensing in development. *Nat. Cell Biol.* 2017;19(6):581–588. DOI: 10.1038/ncb3524.
3. Keller K., Peters D. Pathogenesis of glaucoma: Extracellular matrix dysfunction in the trabecular meshwork – A review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2022;50(2):163–182. DOI: 10.1111/ceo.14027.
4. Pouw A., Greiner M., Coussa R., Jiao C., Han I., Skeie J. et al. Cell-matrix interactions in the eye: from cornea to choroid. *Cells.* 2021;10(3):687. DOI: 10.3390/cells10030687.
5. Коленков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Климонтов В.В., Черных Д.В., Черных В.В. и др. Персонализированный иммуногенетический прогноз предрасположенности человека к офтальмопатологии различного генеза *Сибирский научный медицинский журнал.* 2019;39(3):6–14. DOI: 10.15372/SSMJ20190301.

6. Lu Y., Zhou D., Lu H., Xu F., Yue J., Tong J. et al. Investigating a downstream gene of Gpmb using the systems genetics method. *Mol. Vis.* 2019;25:222–236.
7. Вейр Б. Анализ генетических данных. Дискретные генетические признаки; пер. с англ. М.: Мир, 1995:400.
8. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. М.: Медицина, 1983:296.
9. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. СПб.: ВМедА, 2002:266.
10. Наркевич А.Н., Виноградов К.А., Гржибовский А.М. Множественные сравнения в биомедицинских исследованиях: проблема и способы решения. *Экология человека.* 2020;10:55–64. DOI: 10.33396/1728-0869-2020-10-55-64.
11. Andia D., Letra A., Casarin R., Casati M., Line S., Souza A. Genetic analysis of the IL8 gene polymorphism (rs4073) in generalized aggressive periodontitis. *Arch. Oral Biol.* 2013;58(2):211–217. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.05.008.
12. Lorente L., Martín M., Plasencia F., Solé-Violán J., Blanquer J., Labarta L. et al. The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2013;17(3):94. DOI: 10.1186/cc12739.
13. Alp E., Yilmaz A., Tulmac M., Ugras Dikmen A., Cengel A., Yalcin R. et al. Analysis of MMP-7 and TIMP-2 gene polymorphisms in coronary artery disease and myocardial infarction: A Turkish case-control study. *Kaohsiung. J. Med. Sci.* 2017;33(2):78–85. DOI: 10.1016/j.kjms.2016.12.002.
14. Abd-Allah S., Shalaby S., Pasha H., El-Shal A., Abou El-Saoud A. Variation of matrix metalloproteinase 1 and 3 haplotypes and their serum levels in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2012;16(1):15–20. DOI: 10.1089/gtmb.2011.0003.
15. Zhang L., Wu G., Herrle F., Niedergethmann M., Keese M. Single nucleotide polymorphisms of genes for EGF, TGF- β and TNF- α in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics.* 2012;9(5):287–295.
16. Bayat A., Stanley J., Watson J., Ferguson M., Ollier W. Genetic susceptibility to Dupuytren's disease: transforming growth factor beta receptor (TGFbetaR) gene polymorphisms and Dupuytren's disease. *Br. J. Plast. Surg.* 2003;56(4):328–333. DOI: 10.1016/s0007-1226(03)00176-0.
17. Armstrong R.A. When to use the Bonferroni correction ophthalmic. *Physiol Opt.* 2014;34(5):502–508. DOI: 10.1111/opo.12131.
18. Velkovska M.A., Goričar K., Blagus T., Dolžan V., Cvenkel B. Association of genetic polymorphisms in oxidative stress and inflammation pathways with glaucoma risk and phenotype. *J. Clin. Med.* 2021;10(5):1148. DOI: 10.3390/jcm10051148.
19. Belmares R., Raychaudhuri U., Maansson S., Clark A.F. Histological investigation of human glaucomatous eyes: Extracellular fibrotic changes and galectin 3 expression in the trabecular meshwork and optic nerve head. *Clin. Anat.* 2018;31(7):1031–1049. DOI: 10.1002/ca.23263.
20. Черных В.В., Коненков В.И., Орлов Н.Б., Ермакова О.В., Ходжаев Н.С., Трунов А.Н. Особенности содержания трансформирующих факторов роста – бета 1, 2, 3 (TGF-бета1, TGF-бета2, TGF-бета3) во внутриглазной жидкости при первичной открытоугольной глаукоме. *Офтальмохирургия.* 2019;2:13–17. DOI: 10.25276/0235-4160-2019-2-13-17.
21. Rezaei N., Aghamohammadi A., Mahmoudi M., Shakiba Y., Kardar G., Mahmoudi M. et al. Association of IL-4 and IL-10 gene promoter polymorphisms with common variable immunodeficiency. *Immunobiology.* 2010;215(1):81–87. DOI: 10.1016/j.imbio.2009.01.011.
22. Bestach Y., Nagore V., Flores M., González J., Arbelbide J., Watman N. et al. Influence of TNF and IL6 gene polymorphisms on the severity of cytopenias in Argentine patients with myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* 2017;96(8):1287–1295. DOI: 10.1007/s00277-017-3036-4.
23. Кириллова М., Журавлева А., Марахонов А., Петрова Н., Балинова Н., Зинченко Р. и др. Полиморфизмы генов, связанных с ремоделированием соединительной ткани, как маркеры доклинической диагностики первичной открытоугольной глаукомы у пациентов с наследственной предрасположенностью. *Медицинская генетика* 2021;20(5):26–33. DOI: 10.25557/2073-7998.2021.05.26-33.
24. Ji M.-L., Jia J. Correlations of TIMP2 and TIMP3 gene polymorphisms with primary open-angle glaucoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2019;23(13):5542–5547. DOI: 10.26355/eur-rev_201907_18287.
25. Markiewicz L., Majsterek I., Przybyłowska K., Dżiki L., Waszczyk M., Gacek M. et al. Gene polymorphisms of the *MMP1*, *MMP9*, *MMP12*, *IL-1 β* and *TIMP1* and the risk of primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol.* 2013;91(7):e516–523. DOI: 10.1111/aos.12149.
26. Xin X., Gao L., Wu T. Roles of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms, tumor necrosis factor alpha level in aqueous humor, and the risks of open angle glaucoma: A meta-analysis. *Mol. Vis.* 2013;19:526–535.

Вклад авторов

Коненков В.И. – разработка концепции и дизайна исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания, написание текста статьи. Шевченко А.В. – проведение лабораторных исследований, аналитическая и статистическая обработка данных, написание текста статьи. Прокофьев В.Ф. – аналитическая и статистическая обработка данных, написание текста статьи. Черных В.В. – разработка концепции и дизайна исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания. Трунов А.Н. – обоснование рукописи и разработка дизайна, отбор пациентов для исследования, написание текста статьи.

Информация об авторах

Коненков Владимир Иосифович – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики, научный руководитель НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, vikonenkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7385-6270>

Шевченко Алла Владимировна – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммуногенетики, НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, shalla64@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5898-950X>

Прокофьев Виктор Федорович – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммуногенетики, НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, vprok@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7290-1631>

Трунов Александр Николаевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель научного отдела, НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова», Новосибирский филиал, г. Новосибирск, trunov1963@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7592-8984>

Черных Валерий Вячеславович – д-р мед. наук, профессор, директор НМИЦ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова», Новосибирский филиал, г. Новосибирск, sci@mntk.nsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7623-3359>

(✉) Шевченко Алла Владимировна, shalla64@mail.ru

Поступила в редакцию 06.02.2023;
одобрена после рецензирования 20.02.2023;
принята к публикации 23.03.2023