

На правах рукописи

КИРИЛЕНКО Михаил Юрьевич

**ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ
ФАКТОРОВ РОСТА С ФОРМИРОВАНИЕМ И КЛИНИЧЕСКИМ
ТЕЧЕНИЕМ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Белгород – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Чурносов Михаил Иванович

Официальные оппоненты:

Зинченко Рена Абульфазовна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, заведующая лабораторией генетической эпидемиологии

Голубцов Виктор Иванович, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет», заведующий кафедрой биологии с курсом медицинской генетики

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ года в _____ часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России и на сайте www.bsu.edu.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

И.о. ученого секретаря совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13
доктор медицинских наук



С.П. Пахомов

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Глаукома – это хроническая патология глаз различной этиологии, характеризующаяся периодическим или постоянным повышением внутриглазного давления (ВГД) и сопровождающаяся прогрессирующей оптической нейропатией, которая проявляется атрофией зрительного нерва (с экскавацией) и характерными изменениями поля зрения [Sacca S.C. et al., 2009; Кански Д., 2010; Егоров Е.А., 2013]. В настоящее время по данным ВОЗ в мире около 68 млн. человек страдает глаукомой. Число ослепших вследствие глаукомы составляет 5,2 - 9,1 млн. человек, и их число неуклонно увеличивается [Quigley H., 2006; Pascolini D. et al., 2012]. Среди причин неустраняемой слепоты в России глаукома занимает одно из ведущих мест, превышая среднеевропейский показатель в 1,5-2 раза [Либман Е.С., 2010]. По результатам многоцентровых эпидемиологических исследований за последние пять лет удельный вес глаукомы среди причин инвалидности по зрению значительно возрос с 20 до 28%, распространенность увеличилась с 0,12 до 0,62 и более на 10 тысяч населения субъекта федерации в зависимости от его особенностей и возрастной группы жителей [Либман Е.С., 2009]. При этом только половина заболевших знают о своем диагнозе и лишь четверть из них получает адекватное лечение [Quigley H., 2011]. В начальной стадии глаукома протекает практически бессимптомно, данное заболевание часто выявляется на стадиях, когда изменения зрительного нерва уже необратимы [Нестеров А.П., 2008].

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – это форма глаукоматозного процесса встречающаяся наиболее часто (от 72,3 до 96,1% всех видов глауком) [Нестеров А.П., 2008]. ПОУГ является мультифакториальным заболеванием [Banerjee D. et al., 2012], в этиопатогенезе которого важная роль принадлежит факторам роста (*VEGF-A*, *IGF-1*, *TGF β -1*, *IGFR-1*), регулирующим продукцию внеклеточного матрикса, участвующим в процессах репарации, влияющим на ангиогенез, пролиферацию и апоптоз клеток [Никитин Н.А. и др., 2009; Fingert J., 2011; Kirwan R. et al., 2012].

В последние годы проводятся активные исследования ПОУГ ассоциированных генов [Fuse N., 2010]. Однако, следует отметить, что большинство исследований по изучению генов предрасположенности к ПОУГ проведены за рубежом [Ray K. et al., 2009; Wolf C. et al., 2009; Fan B. et al., 2011; Fingert J., 2011; Agarwal R., 2012; Gemenetzi M. et al., 2012; Fuchshofer R. et al., 2012; Lin H. et al., 2014; McDonnell F. et al., 2014]. Единичные работы, проводимые в России, фрагментарны и посвящены оценке вовлеченности в подверженность к ПОУГ лишь генов миоцилина (*MYOC*), оптиневрина (*OPTN*), цитохрома P450 (*CYP1B1*), факторов некроза опухолей и их рецепторов (*TNF α* , *TNF β* , *TNFR1*, *TNFR2*) [Белоусова А.С., 2010; Бикбов М.М и др., 2010; Мотушук А.Е., 2010; Тикунова Е.В., 2014].

Исследования роли полиморфных вариантов генов факторов роста в отношении ПОУГ в РФ до сих пор не проведены, что диктует необходимость выполнения данного исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ «Изучение генетических факторов риска развития мультифакториальных заболеваний человека» (№ 511/2014).

Цель: Изучить ассоциации генетических вариантов факторов роста с формированием и клиническим течением первичной открытоугольной глаукомы.

Задачи:

1. Исследовать роль полиморфных вариантов сосудисто-эндотелиального (*VEGF-A c.-958C>T*), инсулиноподобного (*IGF-1 c.-1410T>C*), трансформирующего (*TGFβ-1 c.-1347T>C*), рецептора инсулиноподобного (*IGFR-1 g.99181663C>T*) факторов роста и их комбинаций в формировании ПОУГ.

2. Проанализировать ассоциации молекулярно-генетических маркеров с клиническим течением ПОУГ.

3. Изучить связи генетических вариантов факторов роста с развитием ПОУГ в зависимости от наличия сопутствующей неинфекционной патологии глаз.

4. Установить вовлеченность генетических полиморфизмов в формирование ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением.

5. Разработать математическую модель прогнозирования риска развития ПОУГ на основе генетических предикторов.

Научная новизна. Впервые выявлены ассоциации генетических полиморфизмов факторов роста *VEGF-A c.-958C>T (rs 833061)*, *IGF-1 c.-1410T>C (rs 35767)*, *TGFβ-1 c.-1347T>C (rs 1800469)*, *IGFR-1 g.99181663 C>T (rs 4965425)* с развитием ПОУГ у русского населения Центрального Черноземья РФ. Установлены генетические маркеры предрасположенности к развитию ПОУГ. Впервые выявлены особенности ассоциаций генов факторов роста с риском развития ПОУГ в зависимости от возраста манифестации и стадии заболевания. Показаны различия в формировании ПОУГ у индивидуумов в зависимости от сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз. Выявлена вовлеченность генов-кандидатов в предрасположенность к развитию ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением. Впервые с использованием данных о генетических полиморфизмах факторов роста разработаны модели индивидуального прогнозирования риска развития ПОУГ.

Научно-практическое значение. Результаты проведенного исследования дополняют представления о молекулярно-генетических факторах развития ПОУГ. Разработанные математические модели прогнозирования риска развития ПОУГ могут быть использованы в практической офтальмологии с целью формирования групп риска по развитию данного заболевания, что позволит своевременно проводить

необходимые лечебно-диагностические мероприятия. Полученные в ходе исследования результаты используются в практической деятельности врачей-офтальмологов медицинского центра микрохирургии глаза «Ковчег» и в учебном процессе в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на IV Международной научной конференции «Клинические и теоретические аспекты современной медицины» (Москва, 2013), VII Международной научной конференции молодых ученых-медиков (Курск, 2013), VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2013), Международной научно-практической конференции «Интегративные процессы в медицине и образовании-2013» (Москва, 2013), XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (СПб, 2013), V международной научной конференции «Инновации в медицине» (Курск, 2013), научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием «Восток–Запад» (Уфа, 2013), X научной конференции «Генетика человека и патология: проблемы эволюционной медицины» (Томск, 2014), Всероссийской научно-практической конференции «Современные достижения региональной офтальмологии» (Тамбов, 2014).

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в выполнении всех этапов исследования: сбор современных литературных данных по изучаемой теме, определении цели и постановке задач исследования, разработке методических подходов их решения, формировании выборок больных ПОУГ и группы контроля, молекулярно-генетическом исследовании, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций, написании и оформлении рукописи, апробации проведенной работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в числе которых 4 в журналах рекомендованных ВАК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Вовлеченность генетических вариантов факторов роста в формирование ПОУГ различается у индивидуумов с наличием/отсутствием сопутствующей неинфекционной патологии глаз.

2. Полиморфизмы генов факторов роста и их комбинации ассоциированы с клиническим течением ПОУГ.

3. Подверженность к развитию ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением связана с полиморфными вариантами генов факторов роста.

4. Генетические варианты по локусу *VEGF-A c.-958C>T*, возраст, уровень систолического и диастолического артериального давления, отягощенный семейный анамнез, наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз, микрососудистых изменений в конъюнктиве, степень

пигментации угла передней камеры являются прогностически ценными маркерами при формировании группы риска развития ПОУГ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, а также выводы, практические рекомендации и список литературы. Материалы диссертации изложены на 136 страницах машинописного текста и содержит 23 таблицы и 15 рисунков. Библиографический указатель содержит 230 наименований, из которых 166 иностранных.

Материалы и методы исследования

Общая характеристика исследуемых групп.

Объектом исследования послужила выборка из 443 человек. Из которых 252 человека составили больные ПОУГ различных стадий и 191 человек контрольной группы. Исследуемые группы были сформированы из индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрального Черноземья РФ и не имеющих родства между собой. В группу больных включались пациенты с ранее установленным или впервые выявленным диагнозом ПОУГ, подтвержденного клиническими, инструментальными и лабораторными методами обследования. Группа контроля была сформирована из индивидуумов, не имеющих острых и хронических заболеваний глаз, у которых отсутствовали какие-либо признаки глаукомы, а также они не имели тяжелых соматических патологий, в том числе приводящих к поражениям глаз. Обследование проводили в офтальмологическом отделении ОГБУЗ Белгородской областной клинической больницы Святителя Иоасафа и медицинском центре микрохирургии глаза «Ковчег».

Среди больных первичной открытоугольной глаукомой (252 человека), как и в группе контроля (191 человек), распределение по полу было одинаковым (больные ПОУГ: женщины - 127 (50,4%), мужчины – 125 (49,6%); контроль: женщины – 98 (51,3%), мужчины – 93 (48,7%)) ($p > 0,05$). Средний возраст больных ПОУГ составил $70,53 \pm 8,43$ лет (изменялся от 46 лет до 89 лет), в контрольной группе $69,24 \pm 10,14$ лет (изменялся от 40 лет до 87 лет) ($p > 0,05$). Распределение соматической патологии среди больных ПОУГ и в контрольной группе было одинаковым ($p > 0,05$). Таким образом, группа больных ПОУГ не отличалась от группы контроля по полу, возрасту, национальности, месту рождения и отягощенности соматопатологией.

В исследуемой группе больных I стадия ПОУГ установлена на 66 глазах (14,67%), II стадия – на 236 глазах (52,44%), III стадия – на 97 глазах (21,56%), IV стадия выявлена в 51 случае (11,33%). Если на разных глазах у одного пациента определялись разные стадии ПОУГ, показатели оценивались по наибольшей стадии, второй глаз в исследование не включался [Рожко Ю.И., 2009; Аветисов С.Э. и др., 2012]. Двусторонность поражения на момент манифестации ПОУГ была выявлена у 198 пациентов (78,57%), односторонний процесс – у 54 (21,43%) ($p > 0,05$).

Молекулярно-генетические методы.

Типирование генетических полиморфизмов факторов роста: *VEGF-A c.-958C>T (rs 833061)*, *IGF-1 c.-1410T>C (rs 35767)*, *TGFβ-1 c.-1347T>C (rs 1800469)*, *IGFR-1 g.99181663 C>T (rs 4965425)* производилось в НИЛ «Молекулярной генетики человека» НИУ «БелГУ».

Анализ генетических маркеров осуществлялся методом ПЦР синтеза ДНК, которая проводилась на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, USA) с использованием олигонуклеотидных зондов и праймеров для ПЦР фирмы «Синтол» (флюоресцентная детекция методом TaqMan).

Генетико-статистические и биометрические методы.

Формирование базы данных и статистические расчеты производились с применением программных пакетов «Statistica» версия 6.0, «Microsoft Office Excel 2007». Вычисление фенотипических и генных частот производили по стандартным методикам [Вейр Б., 1995; Животовский Л.А., 1983; Ли Ч., 1995]. С помощью критерия χ^2 (хи-квадрат) проверяли соответствие наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из правила Харди-Вайнберга. Выявление ассоциаций генетических вариантов анализируемых локусов с формированием ПОУГ проводили с помощью таблиц сопряженности 2x2, на основе вычисления критерия χ^2 (хи-квадрат) с поправкой Йетса на непрерывность. Характер ассоциаций различных аллелей и генотипов с ПОУГ оценивали при помощи показателя отношения шансов (OR) [Реброва О.Ю., 2006]. При проведении множественных сравнений использовали поправку Бонферрони. За статистически значимый уровень принимали $p_{\text{bonf}} \leq 0,05$.

Роль комбинаций аллелей и генотипов исследуемых полиморфных вариантов в формировании генетической предрасположенности к ПОУГ изучена с помощью программного обеспечения «APSampler\Cygwin» [Favorov A.V. et al., 2005; <http://sources.redhat.com/cygwin/>]. Для валидации найденных ассоциаций использовался точный критерий Фишера (p_f) и пермутационный анализ (p_{perm}) [Царева Е.Ю., 2012; Басова Р.М., 2013]. Значимыми считали различия сравниваемых частот, если $p_f < 0,05$ и $p_{\text{perm}} \leq 0,005$, при условии, что значения 95% CI для OR не пересекают 1.

При изучении связей молекулярно - генетических маркеров с количественными признаками, характеризующими клинические и клинико-лабораторные показатели пациентов с ПОУГ использовали методы непараметрической статистики.

С целью прогнозирования риска развития ПОУГ в работе использован метод математического моделирования (дискриминантный анализ) [Реброва О.Ю., 2006].

Результаты исследования и их обсуждение

1. Исследование роли полиморфных вариантов факторов роста и их комбинаций в формировании ПОУГ

В результате изучения частот генотипов исследуемых полиморфизмов установлено, что для всех анализируемых локусов как в группе контроля, так

и в группе больных ПОУГ выполнялось равновесие Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). В настоящей работе не выявлено достоверных различий в частотах генетических вариантов полиморфных локусов факторов роста между больными ПОУГ и контролем. Это согласуется с материалами работы Sripriya S., в которой не установлено статистически значимых отличий между больными ПОУГ и группой контроля по локусу *TGFβ-1 c.-1347T>C* в индийской популяции [Sripriya S. et al., 2007]. В китайской популяции, наоборот, были выявлены значительные различия в распределении полиморфизма *VEGF-A* между контрольной группой и пациентами с ПОУГ: *CC* гомозиготы отсутствовали в контрольной группе [Lin H. et al., 2014].

Наряду с этим наши данные, свидетельствуют о вовлеченности генетических полиморфизмов в формирование ПОУГ у индивидуумов в зависимости от наличия/отсутствия сопутствующей неинфекционной патологии глаз. Определены рискованные и протективные молекулярно-генетические варианты факторов роста и их комбинации, вовлеченные в формирование подверженности к ПОУГ.

Генетический вариант *T IGFR-1* (64,63%) и комбинации аллелей *C VEGF-A*, *T IGFR-1* (75,73%), *C VEGF-A*, *T IGF-1*, *T TGFβ-1* (17,09%) и *T VEGF-A*, *T IGF-1*, *C TGFβ-1* (29,06%) встречаются среди больных ПОУГ чаще, чем в контроле (54,47%, $\chi^2=4,78$, $p=0,03$, $OR=1,53$, 95%CI 1,10-2,20; 49,58%, $p_{perm} = 0,000001$, $OR=3,17$, 95%CI 1,89-5,32; 7,02%, $p_{perm} = 0,003$, $OR=2,72$, 95%CI 1,37-5,43 и 16,11%, $p_{perm} = 0,003$, $OR=2,13$, 95%CI 1,26-3,61, соответственно) и являются факторами риска формирования ПОУГ у индивидуумов без сопутствующей патологии глаз ($OR > 1,0$). Наоборот, среди пациентов контрольной группы наблюдается более высокая частота генотипа *CC IGFR-1* (22,18%) и сочетания *T VEGF-A* и *CC IGF-1* (58,54%) по сравнению с группой больных ПОУГ без сопутствующей патологии глаз (9,43%, $\chi^2=7,28$, $p=0,01$, $p_{bonf}=0,03$, $OR=0,36$; 95%CI 0,17-0,78 и 43,70%, $p_{perm} = 0,003$, $OR=0,55$; 95%CI 0,35-0,85) (рисунок 1).

Сочетание генетических вариантов *C IGF-1* и *C TGFβ-1* встречается среди больных ПОУГ с наибольшей частотой (85,99%) по сравнению с группой контроля (72,31%, $p_{perm}=0,003$, $OR=2,72$, 95%CI 1,25-4,42) и является фактором риска развития ПОУГ у индивидуумов с сопутствующей патологией глаз. Обращает внимание то, что комбинация из трех генетических вариантов *C VEGF-A*, *TC IGF-1* и *C TGFβ-1* встречается среди больных ПОУГ (17,59%) в 11,3 раз чаще, чем в контроле (1,56%, $p_{perm} = 0,0002$, $OR=13,44$, 95%CI 1,82-99,08). Данное сочетание исследуемых полиморфизмов также повышает риск развития ПОУГ у индивидуумов с сопутствующей патологией глаз. Выявлена более низкая частота генотипа *TT TGFβ-1* (9,49%) у пациентов ПОУГ по сравнению с группой контроля (21,54%, $\chi^2=6,52$, $p=0,01$, $p_{bonf}=0,03$, $OR=0,38$; 95%CI 0,18-0,82) (рисунок 2).

Таким образом, следует отметить различия в вовлеченности генетических полиморфизмов факторов роста в формирование ПОУГ у

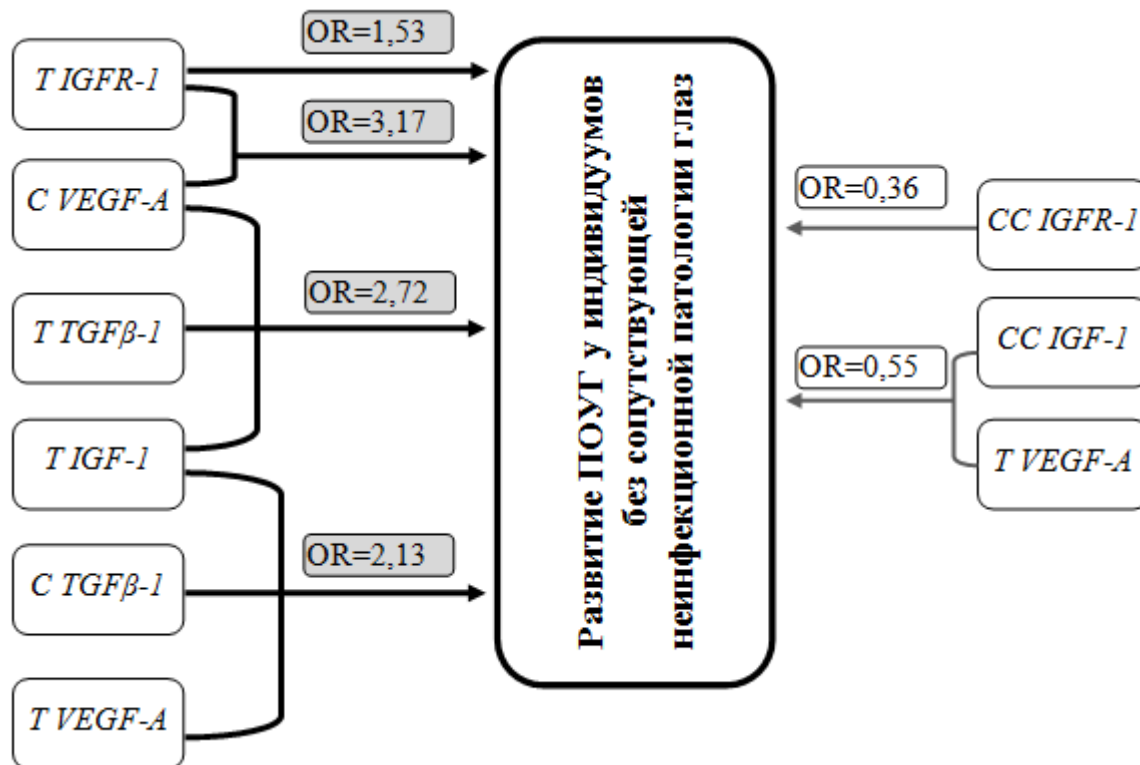


Рис. 1. Генетические факторы формирования ПОУГ у индивидуумов без сопутствующей неинфекционной патологии глаз

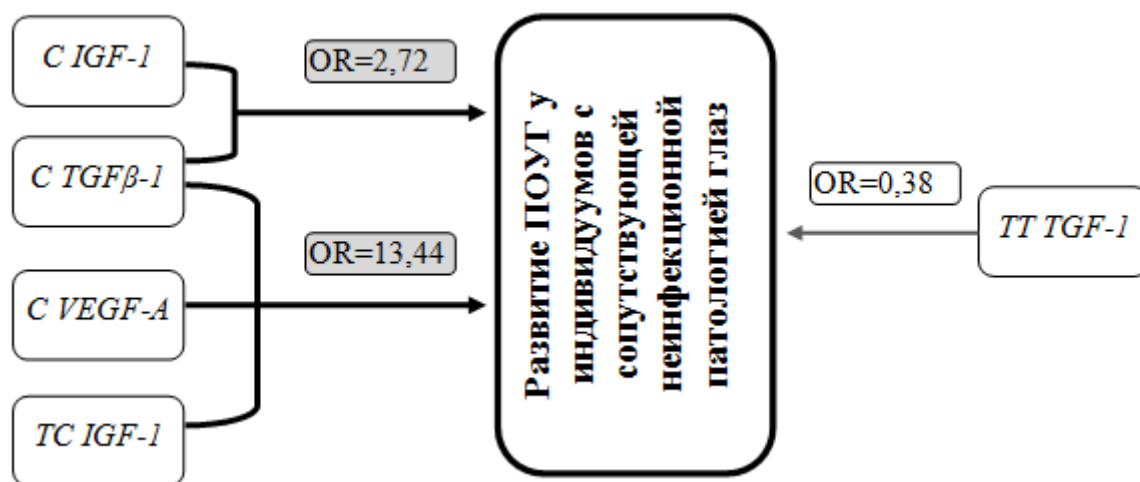


Рис. 2. Ассоциации генетических вариантов факторов роста с развитием ПОУГ у индивидуумов с сопутствующей неинфекционной патологией глаз

индивидуумов в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей неинфекционной патологии глаз. Подверженность к ПОУГ у индивидуумов без сопутствующей неинфекционной патологии связана с 4 комбинациями генетических маркеров и 2 «моноэффектами» генетических полиморфизмов (4 из которых являются факторами риска и 2 комбинации оказывают протективное влияние). Тогда, как предрасположенность к формированию ПОУГ у индивидуумов с сопутствующей неинфекционной патологией глаз определяют 2 комбинации генетических вариантов и 1 «моноэффект» генетического полиморфизма (2 из них являются факторами риска и 1 – протективным фактором). Выявленная нами вовлеченность генетических полиморфизмов факторов роста в формирование ПОУГ согласуется с литературными данными по этому вопросу. Известно, что при ПОУГ потеря нейротрофических влияний на аксоны зрительного нерва обусловлена атрофией глии. Избыточный синтез $TGF\beta-1$ совместно с другими факторами роста ($IGF-1$, $IGFR-1$, $VEGF-A$) приводит к тому, что активированная глия оказывает повреждающее, а не защитное действие на зрительный нерв и сетчатку, обуславливая развитие глаукомной оптической нейропатии [Schlotzer-Schrehardt U. et al., 2001; Schuettauf F. et al., 2005; Kirwan R. et al. 2005; Курышева Н.И., 2006; Fuchshofer R. et al., 2012].

2. Анализ ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с клиническим течением ПОУГ

Проведен анализ вовлеченности генетических полиморфизмов факторов роста в формирование определенных стадий заболевания. Установлено, что комбинации из трех генетических вариантов $T IGF-1$, $C TGF\beta-1$, $T IGFR-1$ и $T IGF-1$, $C TGF\beta-1$, $TT IGFR-1$ встречаются среди больных I стадией ПОУГ (38,89% и 20,37%, соответственно) в 2-4 раз чаще, чем среди контрольной группы (18,84%, $p_{perm}=0,002$ и 5,07%, $p_{perm}=0,002$, соответственно). При наличии этих сочетаний полиморфных маркеров риск развития I стадии ПОУГ повышен (OR=2,74, 95% CI 1,46-5,12 и OR=4,78, 95% CI 2,04-11,23 соответственно). Аналогичной направленности различия зарегистрированы и по комбинации из двух генетических вариантов - $T IGF-1$ с $C TGF\beta-1$. Данная комбинация среди больных I стадией ПОУГ (39,06%) встречается чаще по сравнению с контролем (22,78%, $p_{perm}=0,004$, OR=2,17). Сочетания генетических маркеров, распространенность которых выше в контрольной группе (54,80% и 72,88%), в сравнении с больными I стадией ПОУГ (37,50% и 57,81%), включают следующие комбинации генетических вариантов: $T VEGF-A$ с $CC IGF-1$ и $T VEGF-A$ с $C IGF-1$. Данные сочетания снижают риск развития I стадии заболевания (OR=0,49, $p_{perm}=0,004$, 95% CI 0,28-0,85 и OR=0,50, $p_{perm}=0,004$, 95% CI 0,29-0,88) (рисунок 3).

Подверженность к развитию II стадии ПОУГ связана с аллелем $T IGFR-1$ ($\chi^2=4,25$, $p=0,04$, OR=1,39; 95% CI 1,02-1,90). Сочетание аллелей $C VEGF-A$ и $T IGFR-1$ встречается среди больных ПОУГ (74,05%) в 1,4 чаще, чем в контроле (52,60%, $p_{perm}=0,00001$). Также среди больных II стадией ПОУГ

зарегистрирована наибольшая частота сочетания трех генетических маркеров *C VEGF-A*, *T IGF-1*, *T TGFβ-1* (17,57%) по сравнению с контролем (7,84%, $p_{perm}=0,0006$). Данные комбинации полиморфных вариантов генов факторов роста являются факторами риска развития II стадии ПОУГ (OR=2,57, 95% CI 1,72-3,83 и OR=2,50, 95% CI 1,46-4,30, соответственно) (рисунок 4).

Обращают на себя внимание выявленные различия в вовлеченности генетических вариантов факторов роста в формирование I и II стадии ПОУГ. Подверженность к формированию I стадии ПОУГ связана с 5 комбинациями генетических маркеров (в составе которых 3 комбинации генетических полиморфизмов являются факторами риска развития I стадии ПОУГ и 2 комбинации генетических маркеров оказывают протективное действие). Тогда как в формирование II стадии ПОУГ вовлечены 2 комбинации генетических вариантов факторов роста и 1 «моноэффект» генетического полиморфизма. Все выявленные генетические маркеры являются факторами риска развития II стадии ПОУГ. Полученные данные согласуются с результатами работы Тикуновой Е.В., в которой также были выявлены различия в формировании подверженности к ПОУГ определенных стадий по генам факторов некроза опухолей и их рецепторов [Тикуновой Е.В., 2014].

ПОУГ является возраст-ассоциированным заболеванием, проявляясь в большинстве случаев после 65 лет [Кански Д., 2010]. Установлено, что возраст возникновения ПОУГ в исследуемой выборке составил 70 лет (M_e) (нижний квартиль $Q_{25}=62$ года, верхний квартиль $Q_{75}=74$ лет). Выявлены ассоциации возраста манифестации заболевания с генетическим полиморфизмом *VEGF-A c.-958C>T*. Индивидуумы с генетическими вариантами *TT VEGF-A* и *CT VEGF-A* имели более позднее возникновение ПОУГ ($M_e = 70$ лет, $Q_{25} - 63$ лет, $Q_{75} - 75$ лет) по сравнению с индивидуумами с генотипом *CC VEGF-A* ($M_e = 66$ лет, $Q_{25} - 60$ лет, $Q_{75} - 73$ лет) ($p=0,04$) (рисунок 5). Таким образом, генотип *CC VEGF-A (rs 833061)* является генетическим маркером ранней манифестации ПОУГ.

Одними из значимых факторов характеризующих развитие и прогрессирование ПОУГ являются показатели гидродинамики глаз (истинное ВГД (P_o , мм рт. ст.), коэффициент легкости оттока ВГЖ (C , $mm^3/min./mm$ рт. ст.)) [Егоров Е.А., 2008]. Установлено, что индивидуумы с генотипом *CC* и *TC* по локусу *IGF-1* имели более высокое значение истинного ВГД ($M_e = 22,3$ мм рт. ст., $Q_{25}=18,4$, $Q_{75}=24,9$) и соответственно более низкий показатель коэффициента легкости оттока ВГЖ ($M_e = 0,15$ $mm^3/min./mm$ рт. ст., $Q_{25}=0,11$, $Q_{75}=0,23$) в сравнении с индивидуумами с генотипом *TT IGF-1*, у которых P_o ($M_e = 19,7$ мм рт. ст., $Q_{25}=16,7$, $Q_{75}=21,7$, $p=0,04$) и C ($M_e = 0,20$ $mm^3/min./mm$ рт. ст., $Q_{25}=0,16$, $Q_{75}=0,25$, $p=0,02$) были ниже (рисунок 6).

Таким образом, у индивидуумов с генотипами *CC* и *TC IGF-1* зарегистрированы более высокие значения истинного ВГД и низкие показатели коэффициента легкости оттока ВГЖ, что может служить генетическим маркером неблагоприятного течения глаукоматозного процесса.

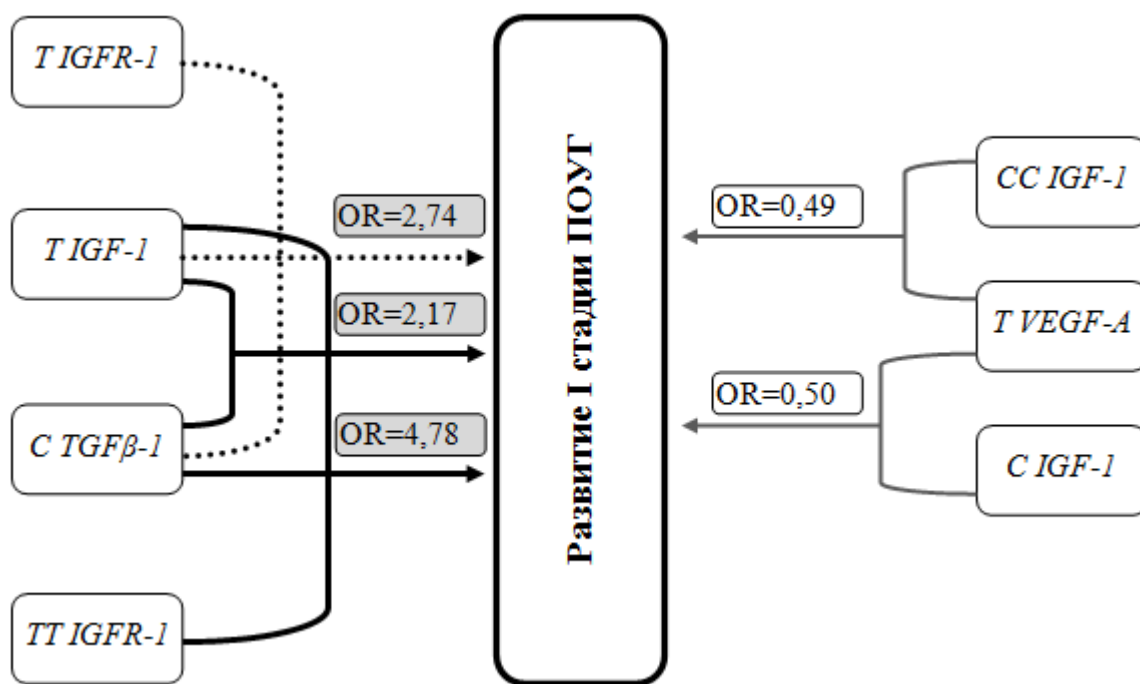


Рис. 3. Вовлеченность генетических вариантов факторов роста в формирование I стадии ПОУГ

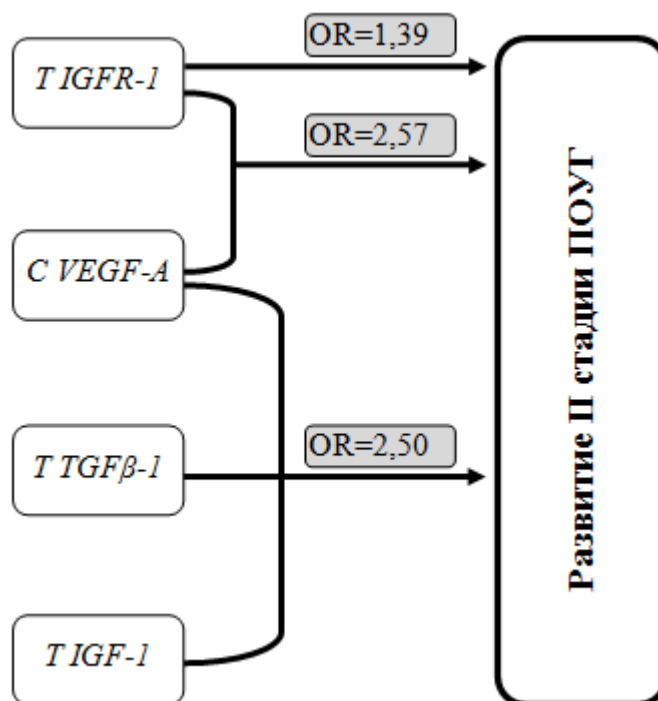


Рис. 4. Ассоциации полиморфных вариантов факторов роста с развитием II стадии ПОУГ

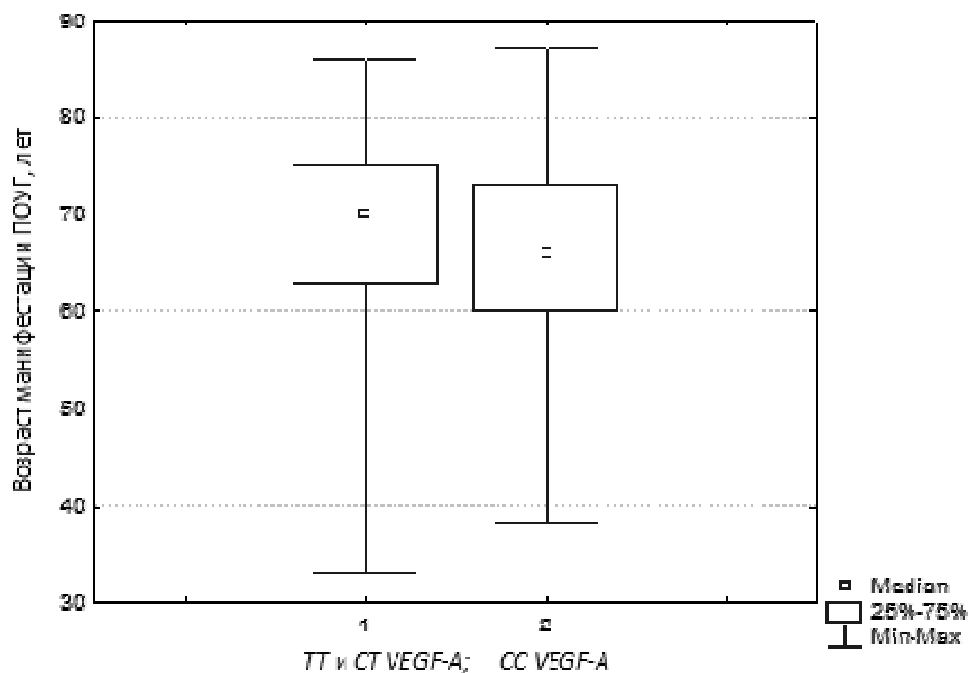


Рис. 5. Возраст манифестации заболевания у больных ПОУГ в зависимости от генетических вариантов полиморфизма *VEGF-A* с.-958C>T (*rs* 833061)

Согласно результатам работы Tsai F. et al. (2003) у населения Китая *IGF-2* может выступать в качестве генетического маркера ПОУГ. Генотип *CC* полиморфного участка гена *IGF-2* ассоциирован с высоким ВГД и выраженной ишемией, что влияет на процесс апоптоза зрительного нерва.

3. Исследование вовлеченности генетических полиморфизмов в формирование ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением

Повышенное ВГД является одним из ведущих факторов риска прогрессирования ГОН [Куроедов А.В. и др., 2008; Jonas J., 2014]. Медикаментозное лечение различными комбинациями гипотензивных препаратов не всегда способно удерживать ВГД на уровне толерантного [Егоров Е.А., 2013]. Установлена более высокая концентрация аллеля *T IGFR-1* (63,06%) у больных ПОУГ по сравнению с группой контроля, где анализируемый показатель составил 56,02% ($\chi^2=4,47$, $p=0,03$, $OR=1,34$; 95% CI 1,02-1,76). Концентрация сочетания генетических вариантов *C VEGF-A* и *T IGFR-1* среди больных ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением (67,82%) выше, чем среди контрольной группы (52,60%, $p_{perm} = 0,0003$). Данное сочетание аллелей исследуемых полиморфизмов повышает риск развития ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением ($OR=1,90$, 95% CI 1,29-2,80). Литературные данные по этому вопросу, свидетельствуют, что в водянистой влаге пациентов ПОУГ уровень *IGF-1* и *IGFR-1* повышен [Zilfyan A., 2013]. По данным ряда работ их высокие

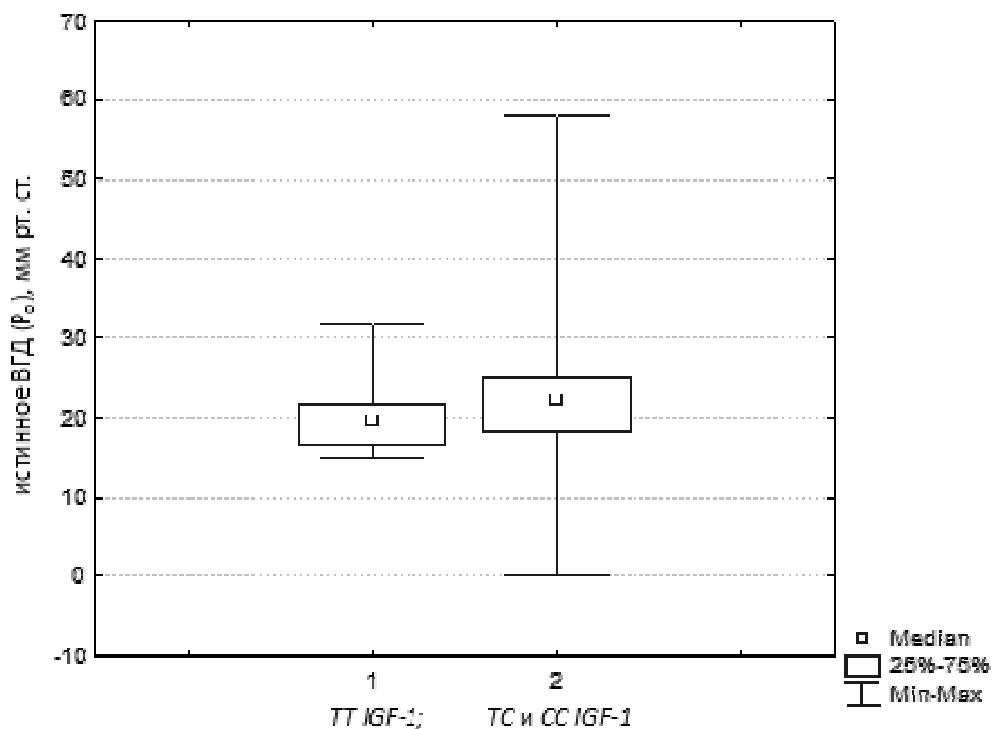


Рис. 6. Показатель истинного ВГД (P_0) у больных ПОУГ в зависимости от генетических вариантов локуса *IGF-1* с.-1410T>C (rs 35767)

концентрации связаны с нарушенной дренажной функцией трабекулярной сети, что обуславливает увеличение ВГД [Tripathi V. et al., 2004; Ko J. et al., 2009]. В результате других исследований было определено, что уровень *VEGF-A* увеличен в плазме крови и во внутриглазной жидкости пациентов с глаукомой по сравнению с контрольной группой [Lip P. et al., 2002; Hu D. et al., 2002; Ergorul C. et al., 2008].

4. Прогнозирование риска развития ПОУГ с использованием генетических данных

С практической точки зрения представляется крайне необходимым выделение критериев индивидуального прогноза риска развития ПОУГ на основании исследованных полиморфных вариантов генов факторов роста и других возможных факторов риска с целью выявления индивидуумов, предрасположенных к глаукоме. Для решения этой задачи нами использован метод многомерной статистики – линейный дискриминантный анализ (ЛДФ) [Реброва О.Ю., 2006].

Согласно разработанной модели прогностически значимыми факторами развития ПОУГ являются возраст (x_1), уровень систолического и диастолического артериального давления (САД - x_2 , ДАД - x_3), отягощенный семейный анамнез (x_4), наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз (x_5), микрососудистых изменений в конъюнктиве (x_6), степень пигментации угла передней камеры (x_7), генетический вариант по

локусу *VEGF-A* с.-958C>T (x₈) (таблица 1). С помощью полученных коэффициентов дискриминантной функции, на основе значений конкретных показателей у индивидуумов можно определить их вероятностную принадлежность к группе больных ПОУГ или к группе контроля. Точность распознавания индивидуумов относящихся к группе больных ПОУГ составляет 91,70%, а к группе контроля – 91,06%. Для валидации модели в уравнения ЛДФ подставляются значения соответствующих показателей у конкретного индивидуума и высчитываются новые признаки – D. Индивидуумы включаются в ту группу (больные или контроль), для которой полученный признак D будет наибольшим [Боровиков В.П., 2001].

Таблица 1

Параметры линейных дискриминантных функций для пациентов ПОУГ и контрольной группы

| | Признаки | Больные ПОУГ | Группа контроля |
|----|--|---------------------|------------------------|
| 1. | Возраст (лет) | 1,175 | 1,089 |
| 2. | САД (мм рт. ст.) | 0,383 | 0,308 |
| 3. | ДАД (мм рт. ст.) | 0,892 | 0,953 |
| 4. | Отягощенный семейный анамнез (нет-0; есть-1) | 5,434 | 3,483 |
| 5. | Наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз (нет-0; есть-1) | 2,742 | 0,243 |
| 6. | Микрососудистые изменения в конъюнктиве (нет-0; есть-1) | -14,578 | -11,515 |
| 7. | Степень пигментации угла передней камеры (нет-0; I степень-1; II степень-2; III степень-3; IV степень-4) | -0,391 | -2,607 |
| 8. | Генетический вариант по локусу <i>VEGF-A</i> с.-958C>T (TT+CT-1; CC-2) | 8,193 | 7,026 |
| | Константа | -110,685 | -94,672 |

Например, у индивидуума А. определены следующие показатели: возраст – 71 год, уровень систолического артериального давления – 130 мм рт. ст., уровень диастолического артериального давления – 80 мм рт. ст., отягощенный семейный анамнез – есть (1), наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз – есть (1), микрососудистые изменения в конъюнктиве – есть (1), III степень пигментации угла передней камеры (3), генетический вариант по локусу *VEGF* – CC (2).

D (больные ПОУГ) = -110,685 + 1,175*71 + 0,383*130 + 0,892*80 + 5,434*1 + 2,742*1 - 14,578*1 - 0,391*3 + 8,193*2 = 102,7

D (группа контроля) = -94,672 + 1,089*71 + 0,308*130 + 0,953*80 + 3,483*1 + 0,243*1 - 11,515*1 - 2,607*3 + 7,026*2 = 97,4

Наибольшее значение нового признака D для этого индивидуума получено при расчётах в уравнении ЛДФ для больных ПОУГ, что позволяет включить данного пациента в эту группу. Дальнейшее наблюдение и

детальное клинико-инструментальное обследование этого индивидуума выявило у него ПОУГ.

На следующем этапе работы построена статистическая модель прогнозирования риска развития ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением, включающая следующие предикторы: возраст (x_1), наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз (x_2), микрососудистых изменений в конъюнктиве (x_3), степень пигментации угла передней камеры (x_4), наличие псевдоэкзофолиативного синдрома (ПЭС) (x_5), генетический вариант по локусу *VEGF-A c.-958C>T* (x_6). В данном случае, исследуемые нами группы по набору из шести изученных признаков демонстрируют неслучайную межгрупповую вариацию. Полученные значения критериев Уилкса, F-критериев, вероятности P и показателей толерантности исключают мультиколлениарность признаков ($p \leq 0,05$, $T < 0,10$) [Дерябин В.Е., 2001]. Для пациентов ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением и контрольной группы получены следующие уравнения ЛДФ:

- для включения в группу больных ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением:

$$D = -41,126 + 0,994 * x_1 + 0,654 * x_2 - 9,637 * x_3 + 1,471 * x_4 + 1,869 * x_5 + 8,208 * x_6$$

- для включения в контрольную группу:

$$D = -30,164 + 0,910 * x_1 - 1,009 * x_2 - 6,575 * x_3 - 1,561 * x_4 + 0,511 * x_5 + 7,094 * x_6$$

Выявление пациентов группы риска неблагоприятного течения ПОУГ, у которых даже максимальная комбинация гипотензивных препаратов не позволяет достичь «давления цели» (толерантного ВГД), требует более частого диагностического контроля и раннего оперативного антиглаукоматозного лечения, вследствие высокого риска прогрессирования заболевания.

Выводы

1. Генетические варианты сосудисто-эндотелиального (*VEGF-A c.-958C>T*, *rs 833061*), инсулиноподобного (*IGF-1 c.-1410T>C*, *rs 35767*), трансформирующего (*TGFβ-1 c.-1347T>C*, *rs 1800469*), рецептора инсулиноподобного (*IGFR-1 g.99181663C>T*, *rs 4965425*) факторов роста и их комбинации ассоциированы с развитием и клиническим течением ПОУГ.

2. Генетический вариант *T IGFR-1* (OR=1,55) и комбинации аллелей *C VEGF-A c T IGFR-1* (OR=3,17), *C VEGF-A, T IGF-1, T TGFβ-1* (OR=2,72), *T VEGF-A, T IGF-1, C TGFβ-1* (OR=2,13) являются факторами риска, а генотип *CC IGFR-1* (OR=0,36) и сочетание *T VEGF-A c CC IGF-1* (OR=0,55) оказывают протективное влияние на формирование ПОУГ у индивидуумов без сопутствующей патологии глаз. Сочетание генетических вариантов *C IGF-1 c C TGFβ-1* (OR=2,72) и *C VEGF-A, TC IGF-1, C TGFβ-1* (OR=13,44) является фактором риска развития ПОУГ, а генотип *TT TGFβ-1* снижает риск развития ПОУГ (OR=0,38) у индивидуумов с сопутствующей патологией глаз.

3. Развитие I стадии ПОУГ ассоциировано с комбинациями генетических вариантов *T IGF-1*, *C TGFβ-1*, *T IGFR-1* (OR=2,74), *T IGF-1*, *C TGFβ-1*, *TT IGFR-1* (OR=4,78), *T IGF-1* с *C TGFβ-1* (OR=2,17). Снижают риск развития I стадии заболевания сочетания генетических маркеров *T VEGF-A* с *CC IGF-1* (OR=0,49) и *T VEGF-A* с *C IGF-1* (OR=0,50). Подверженность к развитию II стадии ПОУГ связана с аллелем *T IGFR-1* (OR=1,39) и комбинациями генетических вариантов *C VEGF-A* с *T IGFR-1* (OR=2,57), *C VEGF-A*, *T IGF-1*, *T TGFβ-1* (OR=2,50).

4. Генетическим маркером ранней манифестации ПОУГ является генотип *CC VEGF-A*. Индивидуумы с генотипами *TC* и *CC IGF-1* имеют более высокие значения истинного внутриглазного давления и низкие показатели коэффициента легкости оттока внутриглазной жидкости, по сравнению с пациентами с генетическим вариантом *TT IGF-1*.

5. Сочетание генетических вариантов *C VEGF-A* с *T IGFR-1* (OR=1,90) и аллель *T IGFR-1* (OR=1,34) повышают риск развития ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением. Прогностически значимыми факторами развития ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением являются генетический маркер *VEGF-A c.-958C>T*, возраст, наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз, микрососудистых изменений в конъюнктиве, степень пигментации угла передней камеры, наличие псевдоэксфолиативного синдрома.

6. Прогностически значимыми факторами развития ПОУГ являются генетический полиморфизм *VEGF-A c.-958C>T*, возраст, уровень систолического и диастолического артериального давления, отягощенный семейный анамнез, наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз, микрососудистых изменений в конъюнктиве, степень пигментации угла передней камеры.

Практические рекомендации

1. С целью индивидуального прогнозирования риска развития ПОУГ использовать уравнения линейных дискриминантных функций, включающие в себя следующие признаки: генетический полиморфизм *VEGF-A c.-958C>T*, возраст, уровень систолического и диастолического артериального давления, отягощенный семейный анамнез, наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз, микрососудистых изменений в конъюнктиве, степень пигментации угла передней камеры.

2. Для прогнозирования риска развития ПОУГ с неэффективным местным гипотензивным лечением рекомендовано использовать модель, включающую следующие факторы: генетический маркер *VEGF-A c.-958C>T*, возраст, наличие сопутствующих неинфекционных заболеваний глаз, микрососудистых изменений в конъюнктиве, степень пигментации угла передней камеры, наличие псевдоэксфолиативного синдрома.

3. При комплексном диагностическом обследовании больных ПОУГ рекомендуется использовать в качестве маркеров неблагоприятного течения глаукоматозного процесса генетические варианты *TC* и *CC IGF-1*

ассоциированные с более высокими значениями истинного внутриглазного давления и низкими показателями коэффициента легкости оттока внутриглазной жидкости.

Список сокращений

| | |
|------|--|
| IGF | инсулиноподобный фактор роста |
| IGFR | рецептор инсулиноподобного фактора роста |
| TGFβ | трансформирующий фактор роста |
| VEGF | сосудисто-эндотелиальный фактор роста |
| ВГД | внутриглазное давление |
| ЛДФ | линейная дискриминантная функция |
| ПОУГ | первичная открытоугольная глаукома |

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Кириленко, М.Ю. Вовлеченность полиморфизма гена инсулиноподобного фактора роста –*G1245A IGF-1* в развитие первичной открытоугольной глаукомы / Кириленко М.Ю. // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация». - 2013. - №25 (168), выпуск 24. – С. 170-173.

2. Кириленко, М.Ю. Исследование полиморфизмов генов факторов роста с развитием первичной открытоугольной глаукомы / Кириленко М.Ю. // Фундаментальные исследования. - 2013. - №12, (2). – С. 222-225.

3. Кириленко, М.Ю. Некоторые результаты клинико-генетического исследования больных первичной открытоугольной глаукомой / М.Ю. Кириленко, Е.В. Тикунова, Д.Г. Воронина // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2013. - №1 (специальный выпуск). – С. 251-252.

4. Кириленко, М.Ю. Генетические исследования первичной открытоугольной глаукомы / Кириленко М.Ю., Чурносков М.И. // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и Технические науки. – 2014. – Т. 19, №4. – С. 1140-1142.

5. Тикунова, Е.В. Роль генетических факторов в формировании клинических особенностей первичной открытоугольной глаукомы у пациентов Центрального Черноземья России / Е.В. Тикунова, М.Ю. Кириленко // Клинические и теоретические аспекты современной медицины: материалы IV международной научной конференции, Москва, 18-21 апр. 2012 г. / РУДН, Ун-т Семмелвейс, Будапешт, Венгрия – Москва, 2012. – С. 64.

6. Тикунова, Е.В. Клинические и медико-биологические характеристики больных первичной открытоугольной глаукомы / Е.В. Тикунова, М.Ю. Кириленко // Геронтологический журнал им. В.Ф. Купревича. - 2012. - Т. 3, №1-2. – С. 74.

7. Тикунова, Е.В. Анализ клинических особенностей первичной

открытоугольной глаукомы / Е.В. Тикунова, **М.Ю. Кириленко** // Актуальные вопросы современной клинической и экспериментальной медицины: сб. тр. X науч.-практ. конференции студентов, интернов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых, посвящ. 10-летию Ин-та последипломн. мед. образования; редкол.: Ю.А. Хощенко [и др.]. – Белгород, 2012. – С.101-102.

8. **Кириленко, М.Ю.** Клинические особенности глаукомы и роль наследственных факторов в ее формировании / М.Ю. Кириленко, Е.В. Тикунова // Материалы VII Международной научная конференции молодых ученых-медиков, Курск, 1-2 марта 2013 г. / Курск. гос. мед. ун-т, Воронеж. гос. мед. акад. им. Н.Н. Бурденко, Казан. гос. мед. акад. [и др.]. – Курск, 2013. - Т. 1. - С. 555-559.

9. **Кириленко, М.Ю.** Офтальмологические и генетические особенности прооперированных по поводу глаукомы пациентов / М.Ю. Кириленко, Е.В. Тикунова // Восток-Запад: сборник научных трудов научно-практической конференции по офтальмохирургии с международным участием, Уфа, 6-7 июня 2013 г. / Уфим. научн.-исслед. ин-т глазных болезней АН Респ. Башкортостан»; под ред. проф. М.М. Бикбова. – Уфа, 2013. - С. 185-187.

10. Воронина, Д.Г. Популяционно-генетический анализ полиморфизма гена эндотелиального фактора роста *VEGF-A* (-460T/C; *rs 833061*) среди населения Центрального Черноземья / Д.Г. Воронина, **М.Ю. Кириленко**, М.С. Сергеева // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье. - СПб, 2013. – С. 90. – (материалы XVI всерос. медико-биологической конференции молодых исследователей с международным участием, СПб, 20 апреля 2013 г.).

11. **Кириленко, М.Ю.** Изучение генетических вариантов сосудистого эндотелиального фактора роста (-460T/C *VEGF-A*) у больных глаукомой / Кириленко М.Ю. // Интегративные процессы в медицине и образовании-2013: материалы международной научно-практической конференции. - Москва, 2013. – С. 3-6.

12. **Кириленко, М.Ю.** Связь полиморфизма -509C/T гена трансформирующего фактора роста с формированием первичной открытоугольной глаукомы / Кириленко М.Ю. // Материалы пятой международной дистанционной научной конференции «Инновации в медицине» / КГМУ, Центр.-Чернозем. научн. Центр РАМН, Общерос. общест. организ. «Рос. союз молодых ученых» / Под ред. проф. В.А. Лазаренко, проф. П.В. Калущкого. - Курск, 2013. – с. 95-99.

13. **Кириленко, М.Ю.** Анализ ассоциаций полиморфных маркеров факторов роста с первичной открытоугольной глаукомой / Кириленко М.Ю., Воронина Д.Г., Тикунова Е.В., Чурносоев М.И. // Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины: сб. науч. трудов / под ред. В.А. Степанова. – Томск, 2014. - Вып. 10. – С. 177-178. – (Материалы X научной конференции НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск, 15-17 октября 2014 г.)