

УДК 617.735-007.23-053.9

ВЛИЯНИЕ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА НА РАЗВИТИЕ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Медведева Л. М., Королькова Н. К., Яроцкая Н. Н.

*Учреждение образования «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»,
г. Витебск, Республика Беларусь*

Реферат. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — хроническое, прогрессирующее заболевание, характеризующееся снижением, а впоследствии потерей центрального зрения. Патогенез данного заболевания до конца не изучен. В исследовании мы определяли наличие полиморфных вариантов генов TLR-3, CRP, SOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1, APOE у пациентов с ВМД. В результате получилось, что мутации CFH ($p = 0,0039$) и CAV 1 ($p = 0,0013$) с определенной вероятностью ассоциированы с диагнозом, мутация HTRA 1 ($p = 0,00003$) с высокой вероятностью ассоциирована с диагнозом, а сочетание мутаций CFH, CAV1 и HTRA 1 (0,0000003) почти наверняка ассоциировано с наличием изучаемого заболевания. Без учета гетерозиготных вариантов наиболее значимой для развития ВМД оказалась модель пациентов гомозиготных по мутантному аллелю гена HTRA 1 ($p = 0,0027$). Таким образом, наибольшую связь с развитием ВМД в нашем исследовании имеет полиморфизм гена HTRA 1, а самая лучшая модель — комбинация мутаций CFH, CAV 1, HTRA 1, при сочетании которых прогнозируемый диагноз очень вероятен.

Ключевые слова: возрастная макулярная дегенерация, полиморфизм, гены, HTRA 1.

Введение. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — хроническое, прогрессирующее заболевание, характеризующееся поражением макулярной области сетчатки и снижением, а впоследствии потерей центрального зрения. Эта патология связана с возрастом и является ведущей причиной слабовидения и слепоты у людей старше 60 лет [1]. Значимые изменения при ней происходят в ретинальном пигментном эпителии (РПЭ), мембране Бруха, слое хориокапилляров и уже вторично вовлекается нейроэпителий сетчатки. Существует большое количество классификаций, но общепринятой и используемой остается разделение на «сухую» форму ВМД, которая составляет 85–90 % [2], и «влажную», или неоваскулярную. Патогенез данного заболевания до конца не изучен, но в последние годы большое количество авторов считают ВМД генетически детерминированным заболеванием [1, 3]. В публикациях упоминаются следующие гены: PLEKHA1, HTRA1, CFH, CFB/C2, CRP, комплемент C3, ARMS2, HMCN1/FBLN6, TLR3, ApoE, VEGF A и другие [4, 5], с которыми тем или иным образом связывают развитие ВМД. Во всех генах человека определяются два аллеля (это различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках гомологичных хромосом). Организм может быть гомозиготным по данному гену, когда

форма аллелей в паре одинаковая и гетерозиготным, когда форма аллелей в паре разная. Существует понятие полиморфизма генов, это структурное различие альтернативных вариантов гена (обычно нормального и мутантного). Однонуклеотидный полиморфизм — отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (A, T, G или C) в геноме представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом, он является генетическим маркером. Ряд заболеваний у человека развивается из-за мутаций в определенных генах.

Цель работы — определение наличия полиморфных вариантов генов: толл-подобного рецептора 3 (TLR-3), С-реактивного белка (CRP), митохондриальной супероксиддисмутазы 2 (SOD 2), фактора комплемента H (CFH), кавеолина 1 (CAV 1), сериновой пептидазы 1 (HTRA 1), аполипопротеина E (APOE) у пациентов с ВМД.

Материалы и методы. В исследование были включены 85 человек, 65 из которых были пациенты с ВМД, а 20 без нее. Всем была проведена визометрия, биомикроскопия с высокодиоптрийными линзами и оптическая когерентная томография (ОКТ), на основании которых пациенты были распределены в группы, обследовались оба глаза. В исследуемой группе было 46 женщин и 19 мужчин, в группе

сравнения 14 женщин и 6 мужчин, что составило 70 и 30 % соответственно в двух группах. Средний возраст пациентов на момент обследования составил в исследуемой группе 71,7 года (от 53 до 89 лет), в группе сравнения 71,3 года (от 56 до 83 лет). Таким образом, группы были сопоставимы по полу и возрасту. У всех исследуемых была взята кровь, определен полиморфизм генов: толл-подобного рецептора 3 (TLR-3), С-реактивного белка (CRP), митохондриальной супероксиддисмутазы 2 (SOD 2), фактора комплемента H (CFH), кавеолина 1 (CAV 1), сериновой пептидазы 1 (HTRA 1), аполипопротеина E (APOE) электрофоретическим методом детекции, анализу подвергалась геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НПФ «Литех», Россия), а затем с образцом выделенной ДНК параллельно проводились две

реакции амплификации — с двумя парами аллель-специфичных праймеров (наборы реагентов для анализа однонуклеотидных полиморфизмов, ООО НПФ «Литех», Россия). Детекция амплифицированных фрагментов ДНК проводилась электрофоретическим методом в агарозном геле с помощью «Комплекта реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации» (ООО НПФ «Литех», Россия). Исследовали однонуклеотидные полиморфизмы (SNP — single nucleotide polymorphism) промоторного региона вышеуказанных генов: TLR3-Leu412Phe, CRP-C1444T, SOD 2-T58C, SOD 2-C60T, CFH-Tyr402His, CAV 1-G2891A, HTRA 1 IVSI-625 G>A, APOE-Leu28Pro. В результате определения возможны были три варианта заключений: гомозигота по аллелю 1 (+-), гетерозигота (++) , гомозигота по аллелю 2 (-+) (таблица 1).

Таблица 1 — Интерпретация результатов определения гомо- и гетерозиготности по нормальному и мутантному генам

Аллель 1 (до позиции замены, делеции, инсерции)	Аллель 2 (после позиции замены, делеции, инсерции)	Результат
+	-	Гомозигота по аллелю 1
+	+	Гетерозигота
-	+	Гомозигота по аллелю 2

Результаты и их обсуждение. Ниже представлены результаты исследования полиморфизма генов в исследуемой группе и группе сравнения, где в скобках указан международ-

ный код полиморфизма, что обозначает позицию замены, делеции или инсерции и какая замена произошла (таблица 2).

Таблица 2 — Результаты определения полиморфизма генов

Ген	Исследуемая группа			Группа сравнения		
	Гомозигота по аллелю 1	Гомозигота по аллелю 2	Гетерозигота	Гомозигота по аллелю 1	Гомозигота по аллелю 2	Гетерозигота
TLR 3 (Phe412Leu)	47	5	13	14	2	4
CRP (C3872T)	60	2	3	20	0	0
1 SOD2 (T58C)	65	0	0	20	0	0
2SOD2 (C60T)	58	7	0	20	0	0
CFH (Tyr402His)	51	3	11	20	0	0
CAV 1 (G2891A)	48	2	15	20	0	0
HTRA 1 (ivsi-625G>A)	32	15	18	19	0	1
APOE (Leu28Pro)	65	0	0	20	0	0

Статистическая обработка данных была произведена с помощью программы *Statistica 10*, были построены логистические регрессионные модели для всех исследуемых генов, оп-

ции: вычисление асимптотических стандартных ошибок оценок параметров, метод оценивания использовался Квазиньютоновский (таблица 3).

Таблица 3 — Статистическая значимость логистических регрессионных моделей для мутаций генов

Независимая переменная ($n = 85$)	p	Статистическая значимость
Мутация TLR-3 (Phe412Leu)	0,78	Нет
Мутация CRP (C3872T)	0,096	Нет
Мутация 1 MSOD 2 (T58C)	1,0	Нет
Мутация 2 MSOD 2 (C60T)	0,047	Да, пограничная
Мутация CFH (Tyr402His)	0,0039	Да, высокая
Мутация CAV 1 (G2891A)	0,0013	Да, высокая
Мутация HTRA 1 (ivsi-625G>A)	0,000030	Да, очень высокая
Мутация APOE (Leu28Pro)	1,0	Нет
Комбинация мутаций CFH, CAV 1, HTRA 1	0,0000003	Да, очень высокая
Комбинация мутаций 2 MSOD2, CFH, CAV 1, HTRA 1	0,0000003	Да, очень высокая

Таким образом, мутации генов CFH и CAV 1 с определенной вероятностью ассоциированы с диагнозом ВМД, мутация HTRA 1 с высокой вероятностью ассоциирована с диагнозом. Также оценивалась комбинация наиболее статистически значимых мутантных генов: сочетание мутаций CFH, CAV 1 и HTRA 1 почти наверняка ассоциировано с наличием изучаемого заболевания. В нашем исследовании пол не имел значения в сравниваемых группах. Мутации генов APOE, CRP, 1 SOD 2, 2 SOD 2, TLR 3 не оказали выраженного влияния на развитие заболевания или отсутствовали в них.

Еще проводилась дополнительная оценка качества построенных в результате исследова-

ния значимых моделей с помощью определения отношения несогласия (отношение произведения чисел правильно расклассифицированных наблюдений к произведению чисел неправильно расклассифицированных), чувствительности (способность давать положительный результат при проверке гипотезы), специфичности (способность давать отрицательный результат, когда гипотеза не подтверждается) и коэффициента детерминации (доля дисперсии зависимой переменной, объясняемая рассматриваемой моделью зависимости, то есть объясняющими переменными) (таблица 4).

Таблица 4 — Дополнительная оценка качества построенных значимых моделей

Параметр	Отношение несогласия	Чувствительность, %	Специфичность, %
Мутация CFH	3,25	100	0
Мутация CAV1	3,25	100	0
Мутация HTRA 1	3,25	100	0
Комбинация мутаций CFH, CAV 1, HTRA 1	3,25	70,8	95,0
Комбинация мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1	3,39	73,85	95,0

Отношение несогласия больше 1 показывает, что построенная в результате исследования классификация (разделение на здоровых и пациентов с ВМД) лучше, чем если бы мы просто провели классификацию наугад. Комбинация мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 имеет наилучшее сочетание чувствительности и специфичности. Общая доля объясненной дисперсии, или коэффициент детерминации (R^2) для логистической регрессионной модели с комбинацией мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 в качестве независимых переменных

составляет 71,6 %, что является приемлемым показателем для биомедицинских исследований (значения в интервале 50–80 % считаются приемлемыми, >80 % — хорошими) (таблица 5).

В целом качество полученных моделей хуже, чем при анализе мутаций без разделения на гетеро- и гомозиготные их варианты, но это было сделано для того, чтобы выделить гомозиготы по мутантным генам, так как при варианте гетерозиготы мы не можем с уверенностью сказать, какой из аллелей проявляет свои свойства.

Таблица 5 — Статистическая значимость логистических регрессионных моделей для гомо- и гетерозиготных вариантов некоторых мутантных аллелей

Независимая переменная ($n = 85$)	p	Статистическая значимость
2 MSOD 2 гетерозигота	1,0	Нет
2 MSOD 2 гомозигота по аллелю 2	0,047	Пограничная
CFH гетерозигота	0,011	Допустимая
CFH гомозигота по аллелю 2	0,20	Нет
CAV 1 гетерозигота	0,0027	Высокая
CAV 1 гомозигота по аллелю 2	0,30	Нет
HTRA 1 гетерозигота	0,017	Допустимая
HTRA 1 гомозигота по аллелю 2	0,0027	Высокая

Перечень генов для исследования был выбран исходя из существующих теорий развития ВМД: окислительный стресс — 1 SOD 2 (T58C), 2SOD 2 (C60T); теория хронического воспаления — CAV 1 (G2891A), TLR 3 (Phe412Leu), CRP (C3872T), CFH (Tyr402His), TLR 3 (Phe412Leu); нарушения липидного обмена и заболевания сердечно-сосудистой системы — APOE (Leu28Pro), а также патогенетических процессов (неоваскуляризация), происходящих при ней — HTRA 1(ivsi-625G>A).

Таким образом, самыми значимыми генами в нашем исследовании, полиморфизм которых влияет на развитие ВМД, оказались: CFH, CAV 1, HTRA 1 и в особенности их комбинация. Ген HTRA 1 находится в 10 хромосоме, кодирует фермент сериновую протеазу, которая расщепляет белки во внеклеточном матриксе; связывается с белками семейства трансформирующих факторов роста β и ингибирует их, а эти белки в свою очередь играют важную роль в ангиогенезе. В одном из исследований было показано, что изменение экспрессии именно HTRA 1 в ретинальном пигментном эпителии больше связано с риском возникновения ВМД, чем генов PLEKHA 1 (домен гомолога плекстрина, содержащий A 1) и ARMS 2 (ген предрасположенности к ВМД 2), находящихся в той же хромосоме и роль которых в развитии ВМД также доказана [6]. Это может иметь значение в формировании неоваскулярной ВМД. Ген CFH расположен на длинном плече 1 хромосомы, кодирует фактор комплемента H, участвует в опосредовании иммунного ответа и является ингибитором альтернативного пути активации комплемента. В 2018 г. A. Sodi и соавт. подтвердили связь генотипа CFH Y402H с «сухой» формой ВМД и пигментным ретинитом, что говорит о дисрегуляции системы комплемента и подтверждает теорию хронического воспаления при ВМД. R. L. Klein и соавт. (2005 г.), а также

J. L. Haines и соавт. (2005 г.) независимо друг от друга определили, что вариант CFH Y402H объясняет 43 % ВМД. Ген CAV 1 находится в 7 хромосоме, кодирует каркасный белок, компонент плазматической мембраны кавеол, является ингибитором каскада киназ, супрессором опухолей, участвует в организации внеклеточного матрикса, распределении холестерина, передаче сигналов, эндоцитозе и липидном гомеостазе. Также он является сложным воспалительным регулятором и модулирует хронический воспалительный процесс в сетчатке. Это может тоже говорить в пользу теории хронического воспаления в развитии ВМД.

Заключение. Таким образом, наибольшую связь с развитием ВМД в нашем исследовании имеет полиморфизм гена HTRA 1 ($p = 0,00003$), даже без учета гетерозиготных его вариантов ($p = 0,0027$). Менее значимое влияние оказали мутации в генах CFH ($p = 0,0039$), CAV 1 ($p = 0,0013$). Предположительно оказали незначительное влияние или отсутствовали в генах CRP, SOD 2, APOE, TLR-3. Самой лучшей моделью логистической регрессии, связанной с заболеванием, стала комбинация мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 ($0,0000003$), при сочетании которых прогнозируемый диагноз очень вероятен. Необходимо продолжать более детально изучать генетические аспекты развития ВМД, комплексные полиморфные генотипы, многократно увеличивающие риск развития заболевания, чтобы выстроить логическую патогенетическую цепочку, межгенные и межбелковые взаимодействия при заболевании. Это необходимо для разработки нового патогенетически обоснованного и эффективного лечения, которое будет направлено на более длительное сохранение зрительных функций у пациентов с этим заболеванием. При проведении секвенирования генома человека возможно вычисление всех генных мутаций, играющих роль в развитии ВМД.

Список цитированных источников

1. Бикбов, М. М. Возрастная макулярная дегенерация / М. М. Бикбов, Р. Р. Файзрахманов, А. Л. Ярмухаметова. — М. : Апрель, 2013. — 196 с.
2. Эфендиева, М. Х. Сопоставление характеристик патологических изменений при сухой форме возрастной макулярной дегенерации по данным оптической когерентной томографии и аутофлюоресценции глазного дна / М. Х. Эфендиева, М. В. Будзинская // Практическая медицина. — 2017. — Т. 104, № 3. — С. 108–110.
3. Измайлов, А. С. Лечение «сухой» формы возрастной макулярной дегенерации / А. С. Измайлов // Клиническая офтальмология. — 2017. — № 1. — С. 56–60.
4. Современный подход к лечению возрастной макулярной дегенерации сухой формы / Т. С. Федотова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. — 2014. — Т. 9, № 2. — С. 141–144.
5. Age-related macular degeneration associated polymorphism rs 10490924 in ARMS2 results in deficiency of a complement activator / S. Micklich [et al.] // J. of Neuroinflammation. — 2017. — Vol. 14, № 4. — P. 1–15.
6. Specific correlation between the major chromosome 10q26 haplotype conferring risk for age-related macular degeneration and the expression of HTRA1 / S. M. Liao [et al.] // Molecular vision. — 2017. — Vol. 23. — P. 318–333.

Gene polymorphism influence on the development of age-of-aged macular degeneration

Medvedeva L. M., Korolkova N. K., Yarotskaya N. N.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Age-related macular degeneration (ARMD) is a chronic, progressive disease characterized by damage of the retinamacular area and decreasing, and further loss of central vision. This study included 85 people, 65 with ARMD, and 20 without it. Polymorphism of genes was determined: TLR-3, CRP, SOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1, APOE. As a result of statistical analysis, was found out that CFH ($p = 0.0039$) and CAV 1 ($p = 0.0013$) mutations are associated with the diagnosis with a certain probability, the HTRA 1 ($p = 0.00003$) mutations are associated with the diagnosis with a high probability, and the combination of CFH, CAV1 and HTRA 1 (0.0000003) mutations is highly likely associated with the presence of the studied disease. The most statistically significant for the development of ARMD was the model of patients homozygous for the mutant allele of the HTRA 1 gene ($p = 0.0027$). Thus, the HTRA 1 gene polymorphism has the greatest association with the development of ARMD in our study. The combination of mutations 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 was the best model of logistic regression associated with the disease, the combination of which makes the predicted diagnosis very likely.

Keywords: age-related macular degeneration, polymorphism, genes, HTRA 1.

Поступила 07.06.2022