

# Вопросы клинической офтальмологии

УДК 617.735

## **Роль поліморфних варіантів генів -174 G/C IL6 та -1082G/A і -592C/A IL10 у патогенезі кератоконуса та розвитку рецидивуючих ерозій при гратчастій дистрофії рогівки у пацієнтів з України**

**Л. А. Лівшиць<sup>1</sup>, д-р біол. наук, професор; Г. І. Дрожжина<sup>2</sup>, д-р мед. наук, професор;**

**А. М. Кучеренко<sup>1</sup>, О. В. Івановська<sup>2</sup>, канд. мед. наук; Т. Б. Гайдамака<sup>2</sup>, д-р мед. наук;**

**О. В. Городна<sup>1</sup>, К. В. Середа<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України;

Київ (Україна)

<sup>2</sup>ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України»; Одеса (Україна)

E-mail: livshits@edu.imbg.org.ua

**Вступ.** Кератоконус (КК), ектазія рогівки, є мультифакторним захворюванням зі спадковою схильністю, яке зустрічається у 1:2000 населення. Гратчаста дистрофія строми рогівки є найбільш поширеним в Україні типом (40,2%) серед інших видів спадкових дистрофій – моногенічних захворювань, зумовлених мутаціями в гені *TGFBI* з варіюючими фенотиповими клінічними проявами.

**Мета:** з'ясувати роль поліморфних варіантів генів -174 G/C IL6 та -1082G/A і -592C/A IL10 як факторів спадкової схильності до розвитку кератоконусу, а також рецидивуючих еrozій у пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки з України.

**Матеріал і методи.** Офтальмологічне дослідження проводили з використанням бломікроскопії, офтальмоскопії, кератотопографії, пахіметрії, дистанційної біометрії, гоніоскопії, тонометрії. Генотипування за поліморфними варіантами генів -174 G/C IL6, -1082G/A і -592C/A IL10 проводили з використанням аналізу рестрикцій фрагментів продуктів ПЛР на ДНК-матриці послідовності відповідних поліморфних локусів. Для статистичного аналізу використовували *Fexact-тест*.

**Результати.** Встановлено, що частота гомозигот (AA) за *IL10 rs1800896* була вищою серед хворих з КК (0,25) порівняно з частотою таких індивідів у контрольній групі (0,19). Частота гомозигот (CC) серед хворих з кератоконусом (0,18) за поліморфним локусом -174 G/C гена *IL6* була нижче у порівнянні з частотою індивідів з таким генотипом в контрольній групі (0,22). Отримані дані не досягають порогу значущості, але вказують на тенденцію до асоціації поліморфних варіантів -1082G/A *IL10* та -174 G/C гена *IL6* з ризиком розвитку кератоконуса. В свою чергу, частота носіїв алеля С гена *IL6* у пацієнтів з гратчастою дистрофією і рецидивуючими еrozіями (0,78) була достовірно вищою ( $p < 0,05$ ), ніж серед індивідів з контрольної групи (0,66). Також в групі пацієнтів з рецидивуючими еrozіями частота (0,48) носіїв алеля A гена *IL10 rs1800872* достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищувала частку носіїв цього алеля (0,33) в контрольній групі.

**Висновок.** За результатами проведених досліджень встановлено, що поліморфізми -174G/C гена *IL6*, -592C/A *rs1800872* та -1082G/A *rs1800896* гена *IL10* разом з генами-детермінаторами створюють кумулятивний ефект модифікаторів клінічного фенотипу при кератоконусі та гратчастій дистрофії рогівки.

### **Ключові слова:**

кератоконус, гратчаста дистрофія рогівки, рецидивуючі еrozії, клінічний фенотип, поліморфізм генів інтерлейкінів, спадкова схильність

**Вступ.** Захворювання, пов'язані з патологічними змінами в рогівці, є однією з найбільш актуальних проблем сучасної офтальмології, оскільки вони суттєво впливають на гостроту зору людини і можуть зумовлювати інвалідізацію пацієнтів. Однією з найбільш поширеных патологій рогівки є кератоконус – ектазія рогівки, яка вражає 1 людину на 2000 у загальній популяції [1], або становить від 50 до 230 на 100,000 на-

селення, але може суттєво варіювати в залежності від етнічного складу популяції. Кератоконус розглядають як мультифакторне захворювання зі спадковою складовою, для якого вже визначена ціла низка генів-кандидатів спадкової схильності.

Іншою важливою проблемою вважають гратчасту дистрофію строми рогівки, яка є найбільш поширеним типом спадкових дистрофій на території України з частотою серед інших видів дистрофій близько 40,2%. Гратчаста дистрофія строми рогівки – є чітко генетично детермінованим моногенним захворюванням з варіючими фенотиповими проявами клінічної картини.

Кератоконус (КК) є прогресуючим переважно хронічним, незапальним дистрофічним захворюванням рогової оболонки ока невідомої етіології. Воно характеризується витонченням і розтягуванням строми з подальшим конусовидним випинанням рогівки. Внаслідок цього збільшується кривизна рогівки і змінюються її оптичні властивості, що тягне за собою розвиток в центральній і парацентральній ділянках неправильного астигматизму з істотним зниженням гостроти зору.

Існує ряд доказів, що свідчать на користь спадкової природи КК, тригером якого є фактори навколошнього середовища. Зокрема, білатеральний характер ураження, а також часте поєднання КК зі спадковими захворюваннями і синдромами (синдром Дауна, хвороба Марфана, сліпота Лебера, атрофія зорових нервів, пігментна дегенерація сітківки, катараракта, синдром Крузона і блакитних склер, незавершений остеогенез, IV тип синдрому Елерса-Данло, пролапс мітрального клапана і ін.) [2-5].

Крім того, генетична схильність до КК виявлена в сімейних групах [6, 7], зокрема у монозиготних близнюків, на що вказують результати ряду авторів [8-11]. Слід зазначити, що приблизно 6-23% пацієнтів з КК мають позитивний сімейний анамнез [12, 13]. У родичів хворих з КК 1-го ступеня споріднення ризик виникнення захворювання становить 11% по відношенню до 0,05% в загальній популяції [14]. На сьогоднішній день ідентифіковано ряд генів – кандидатів розвитку КК.

Біометричні параметри ока людини визначаються цілою низкою спадкових і часто пов'язаних між собою кількісних ознак. Одним із найбільш наочних прикладів є центральне витончення рогівки (ЦВР), спадковість якого сягає 95% [15]. У той час як екстремальне витончення рогівки є драматичною клінічною ознакою для рідкісних вроджених захворювань сполучної тканини, включаючи синдром крихкої рогівки (СКР) та кількох типів недосконалого остеогенезу [16, 17], помірне ЦВР залучено до більш поширених захворювань очей у людей старшого віку. Вважається, що ЦВР є визначальною ознакою при кератоконусі [18, 19].

Попередні дослідження асоціації генетичних чинників із захворюванням, проведені в рамках програми (GWAS – Genom Wide Association Study) як для європейської, так і для азіатської груп населення, виявили 11 генетичних локусів асоційованих з ЦВР [20, 21, 22, 23].

Показана асоціація між певними поліморфізмами послідовності генома, зокрема, в гені фактора росту гепатоцитів (HGF) і КК [24]. Незважаючи на те, що кератоконус згідно визначення, є незапальним дистро-

фічним захворюванням рогівки, дослідження, проведені останнім часом, показали суттєву роль цитокінів, протеолітичних ферментів і вільних радикалів у його розвитку [25]. У дослідженнях сльозової рідини (СР) пацієнтів з кератоконусом було виявлено підвищений рівень IL6, TNF- $\alpha$  і MMP-9. Доведено, що тертя очей, при якому в СР підвищується рівень MMP-9, IL6 і TNF- $\alpha$ , є фактором ризику розвитку кератоконуса [26-31].

Ген протизапального цитокіну IL10 експресується у пошкодженному епітелії рогівки. Модельні експерименти з мишами показали, що поліморфізм гена IL10 -1082 G/A (rs1800896) значно впливає на рівень і функціональну активність кодованого білка.

За умови наявності алеля rs1800896 A IL10 зникає сайт упізнавання для фактора C/ЕВР. Таким чином, можна передбачити, що така заміна буде асоційована зі зниженням рівнем експресії гена та продукції відповідного білка, що підтверджується результатами експериментальних досліджень [32, 33]. З огляду на те, що протизапальні цитокіни забезпечують усунення запальних клітин і запобігають виразці та неоваскуляризації в рогівці, ми обрали IL10 rs1800896 як можливий кандидат на генетичну схильність до КК.

У багатьох дослідженнях намагаються з'ясувати вплив цитокінів на загоєння механічних та хімічних пошкоджень епітелію рогівки [34, 35, 36]. Відновлення цілісності рогівки відбувається в результаті складного каскаду взаємодії між епітеліоцитами, кератоцитами строми рогівки, сльозними залозами та нервовими клітинами, який регулюється цитокінами [34]. Так, про-запальні цитокіни IL-1, IL-6 та IL-8 регулюють проліферацію клітин рогівки, їх міграцію та деградацію залишків колагену, а також захищають зону ураження від бактеріальних інфекцій [34, 37].

В якості ймовірних факторів ризику цих хвороб розглядають зокрема два поліморфні варіанта, розташованих в промоторній ділянці гена IL6: -597G/A та -174 G/C. Для цих генетично зчеплених варіантів показана асоціація з рівнем продукції відповідного білка та рівнем циркулюючого С-реактивного протеїну [38].

За результатами проведеного аналізу послідовності регуляторних ділянок гена IL6 нами була обрана для дослідження мононуклеотидна заміна гуаніну на цитозин в положенні -174 G/C промоторної ділянки гена. За результатами передбачення впливу цього поліморфізму на структуру сайтів упізнавання транскрипційних факторів ми встановили, що мононуклеотидна заміна знаходитьться в сайті упізнавання фактора NRD і може призводити до зникнення цис-сайту з промоторної ділянки. Аналіз літературних даних показав наявність досліджень *in vitro*, в яких спостерігали знижений рівень експресії конструктів з алелем -174 C [39]. Okрім цього, було показано, що наявність цієї мононуклеотидної заміни також впливає на здатність комплексу естроген-естрогеновий receptor регулювати активність промотора гена IL6 [40].

В наших попередніх дослідженнях було встановлено, що гени цитокінів експресуються в епітелії рогівки, а їхні поліморфні варіанти асоційовані з ризиком та/або протекторною дією в розвитку рецидивуючих ерозій у хворих на гратчасту дистрофію строми рогівки [41]. Зважаючи на функціональну значущість поліморфних варіантів генів -174 G/C IL6 та IL10 (rs1800896, rs1800872), ми обрали ці генетичні поліморфізми в якості кандидатів спадкової схильності до розвитку кератоконуса та генів модифікаторів фенотипу гратчастої дистрофії строми рогівки.

Тому, метою нашої роботи було з'ясувати роль поліморфних варіантів генів -174 G/C IL6 і -1082G/A і -592C/A IL10 як факторів спадкової схильності до розвитку кератоконуса та рецидивуючих еrozій у пацієнтів з гратчастою дистрофією строми рогівки з України.

### **Матеріал і методи**

#### **Аналіз клінічних даних та формування вибірок.**

Створено банк ДНК пацієнтів, у яких виявлено захворювання на кератоконус, а також пацієнтів з діагнозом гратчаста дистрофія строми рогівки I та I/ІІ типів. Матеріалом дослідження були зразки крові людей із за-значеними діагнозами, відібрани у ДУ "Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України" (Одеса), а також людей з контрольної групи, яка представляла загальну популяцію України, склада-лася з неспоріднених донорів крові з різних регіонів України.

Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об'єкту вивчення, була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

Для включення в дане дослідження були відіbrane пацієнти з кератоконусом, які проходили лікування в ДУ "Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України". Результати популяційної вибірки – контролю – були отримані з наукових матеріалів відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Характеристика досліджених груп пацієнтів представлена в таблиці 1.

Проаналізовано результати генетичного дослідження у 106 хворих (212 очей) кератоконусом у віці від 10 до 67 років ( $M = 31,5 \pm SD 11,82$ ). Серед хворих переважали чоловіки (65%). Молекулярно-генетичне дослідження проведено у 69 пацієнтів з гратчастою дистрофією строми рогівки I (n=46) та проміжного I/ІІА типу (n=23), та з мутаціями Arg124Cys чи Hys626Arg гена TGFBI відповідно. В групі пацієнтів з гратчастою дистрофією з рецидивуючими еrozіями рогівки було 56 осіб, без еrozій в анамнезі – 13 осіб.

#### **Методи клінічного дослідження хворих**

Всім пацієнтам проводили загальне офтальмологічне дослідження: визначення гостроти зору з макси-

**Таблиця 1. Характеристика досліджувальних груп пацієнтів**

Групи пацієнтів	Кількість хворих
Пацієнти з кератоконусом	106
Здорові неспоріднені донори крові (контрольна група)	100
Пацієнти з гратчастою дистрофією рогівки з рецидивуючими еrozіями	56
Пацієнти з гратчастою дистрофією рогівки без рецидивуючих еrozій	13

мальною корекцією та без неї, біомікроскопію, флюоресцеїновий тест, тонометрію, офтальмоскопію.

Хворим з кератоконусом додатково виконували: кератотопографію, пахіметрію, дістанційну біометрію, гоніоскопію.

За класифікацією Amsler-Krumiech (1998) у дослідженіх хворих діагностовано: кератоконус I стадії – (астигматизм  $\leq 5,0$  дптр, кератометрія  $\leq 48,0$  дптр, гострота зору 0,5–1,0) на 24 очах; кератоконус II ст. – (астигматизм 5,0–8,0 дптр, кератометрія  $\leq 53,0$  дптр, пахіметрія  $\geq 400$  мкм, гострота зору 0,1–0,4) – на 52 очах; кератоконус III ст. – (астигматизм 8,0–10,0 дптр, кератометрія  $>53,0$  дптр, пахіметрія 300–400 мкм, гострота зору 0,12) – на 44 очах; кератоконус IV ст. – (кератометрія  $>55,0$  дптр, пахіметрія  $< 200$  мкм, гострота зору 0,01–0,02) – на 83 очах.

#### **Методи генетичного дослідження хворих**

ДНК виділяли з лімфоцитів периферійної крові за допомогою стандартного методу – шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією. Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками та шляхом електрофорезу в 0,6% агарозному гелі. Спектральні характеристики та концентрацію ДНК визначали на приладі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США)

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в автоматичному режимі на термоциклерах "2720 Thermal Cycler" фірми «Applied Biosystems», а також iCycler виробництва фірми «BIO-RAD» (США).

Для аналізу послідовності ділянки ДНК промоторної ділянки гена IL6, що містить мононуклеотидну заміну -174 G/C, використовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) ампліфікації з наступним гідролізом продукту ендонуклеазою рестрикції NlaIII та з подальшою візуалізацією у 2% агарозному гелі.

Поліморфізм -1082G/A локалізований у промоторному регіоні гена IL10 і являє собою однонуклеотидну заміну G на A. Результатом даної заміни є зникнення сайту впізнавання для ендонуклеази рестрикції EcoNI. Тому для детекції поліморфізму -1082G/A гена IL10 проводили ампліфікацію *in vitro* нуклеотидних послідовностей відповідної ділянки даного гена методом ПЛР з подальшим гідролізом продуктів ПЛР фер-

ментом EcoNI. Розділення фрагментів ПЛР продукту гена IL-10 після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції EcoNI аналізували за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму -592C/A гена IL10 проводився на основі методу ПЛР з наступним рестрикційним аналізом методом ПДРФ. Поліморфізм -592C/A являє собою однонуклеотидну заміну С на А в промоторній ділянці гена IL10. Заміна -592C/A веде до появи сайту рестрикції, що призводить до диференційного гідролізу різних алельних варіантів гена IL10 ендонуклеазою рестрикції RsaI і дає можливість їх ідентифікувати. Наявність продуктів ампліфікації та розділення фрагментів ПЛР продукту гена IL10 після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції RsaI аналізували за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятими методами статистики з використанням програмного пакету OpenEpi. Для статистичного аналізу використовували критерії  $\chi^2$  та Fexact-тест.

## **Результати і їх обговорення**

### **Клінічні прояви кератоконуса**

Кератоконус – прогресуюче, переважно двостороннє дистрофічне захворювання рогівки, яке приводить до витончення і деформації рогівки з некоригованим зниженням гостроти зору. Захворювання, як правило, проявляється в молодому, працездатному віці, швидкість прогресування кератоконуса варіє. У досліджених нами хворих вік проявлення перших ознак захворювання складав від 6 до 40 років, ( $M 19,6 \pm SD 7,01$ ) років.

В клініці кератоконуса виділяють субклінічну і клінічно маніфестну форми. Субклінічна форма кератоконуса характеризується появою непрямих ознак (симптомів): скарг астенопічного характеру, формуванням міопічної рефракції в поєднанні з астигматизмом, іноді змішаним, в пубертатному або більш пізньому періоді, зниженням гостроти зору, яка підвищується в умовах діафрагмування, а також зниженням максимальної гостроти зору з оптимальною очковою корекцією, нестабільністю даних офтальмометрії. При біомікроскопії однією з ознак раннього кератоконуса є виражена видимість нервових волокон рогівки та розрідженість строми в парацентральній зоні [2].

При прогресуванні захворювання кератоконус переходить у клінічно маніфестну форму, в якій визначаються звуження оптичного зіuzu в зоні ектазії рогівки і вертикальні смуги на рівні десцеметової оболонки – лінії напруги Фогта, які зникають при натисканні на очне яблуко. По мірі розвитку захворювання з'являються інші явні ознаки кератоконуса: зниження гостроти зору, некоригований або важко коригований астигматизм, формування міопічної рефракції з астигматизмом, частіше неправильним, збільшення заломлюючої сили рогівки і зменшення радіуса її кри-

визни, зменшення товщини рогівки. При подальшому прогресуванні кератоконуса відбувається рубцювання в області вершини конуса з формуванням в цій зоні помутніння рогівки і перехід стоншення до периферії рогівки [2, 3]. Серед досліджених нами хворих переважали пацієнти з розвиненим кератоконусом III–IV стадій – 60% (127 очей). На 6 очах (2,8%) був гострий кератоконус (рис 1 - див. 4 стор. обкладинки).

### **Клінічні прояви гратчастої дистрофії рогівки**

Повна клінічна картина гратчастої дистрофії (ГД) строми рогівки (тип 1) розвивається зазвичай у 3-4 десятирічні життя, включає тріаду характерних клінічних ознак – прозорі з подвійними контурами радіально розгалужені структури, які нагадують гратеги, що локалізуються в передніх та середніх шарах строми, точкові сіроваткового коліру помутніння в поверхневих шарах та центральне дифузне субепітеліальне помутніння [45, 46]. Патогномонічними для ГД є радіально розташовані гратчастоподібні структури з діхотомічним розгалуженням до центру рогівки. Найбільш частою причиною звернення хворих на гратчасту дистрофію рогівки до офтальмолога є рецидивуючі ерозії рогівки, які можуть з'являтися вже в дитинстві. При цьому їх частота, інтенсивність і ступінь виразності супутньої запальної реакції суттєво відрізняються у різних пацієнтів (рис. 2, 3 - див. 4 стор. обкладинки). Пошкодження епітелія є пусковим механізмом розвитку запалення при ГД. Середній вік досліджених нами пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки I типу складав  $41,7 \pm SD 11,2$  років.

Повна клінічна картина проміжного типу I/ІІА гратчастої дистрофії рогівки розвивається на 4-5 десятирічні життя, тріада характерних для ГД клінічних ознак виражена дещо слабше, ніж при I типі гратчастої дистрофії. Цей тип ГД характеризується більш тонкими, у порівнянні з РД типу III-A, гратчастоподібними структурами, асиметричним проявом, відсутністю або досить рідкими рецидивуючими еrozіями рогівки [46]. Середній вік досліджених пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки I/ІІА I типу був дещо більше  $55,3 \pm SD 9,6$  років, що обумовлено більш пізньою маніфестацією цього типу ГД.

### **Результати дослідження поліморфізмів гена IL6 та гена IL10 у хворих з кератоконусом та гратчастою дистрофією рогівки**

Було проаналізовано rs1800896 IL10 у групі з 106 хворих та 100 здорових осіб. Розподіл генотипів та алельних варіантів наведено в таблиці 2.

Порівняльний аналіз показав, що частота гомозиготного (AA) за rs1800896 була вищою у хворих з КК (25%) порівняно з контрольною групою (19%). Ці дані не досягли межі для значущості, але показали тенденцію до взаємозв'язку між гомозиготним генотипом (AA) rs1800896 IL10 та розвитком КК.

Порівняльний аналіз показав, що частота гомозиготного (CC) за поліморфним локусом гена IL6 була більш низькою у хворих з КК (18%) порівняно з контр-

**Таблиця 2.** Частота розподілу генотипів та алеїв за поліморфізмом -1082G/C гена *IL10* у індивідів з України та пацієнтів з діагнозом кератоконус.

Генотип	Контрольна група		Пацієнти з кератоконусом	
	Абсол. кількість	Частота	Абсол. кількість	Частота
GG	23	0,230	29	0,274
GA	58	0,580	51	0,481
AA	19	0,190	26	0,245
n	100		106	
Алель G	104	0,520	109	0,514
Алель A	96	0,480	103	0,491

ольною групою (22%). Ці дані не досягли межі для значущості, але показали тенденцію до взаємозв'язку між гомозиготним генотипом (CC) -174 G/C гена IL6 та ризиком розвитку кератоконуса (табл. 3).

За результатами проведеного нещодавно метааналізу досліджень асоціації кератоконуса з поліморфними варіантами в геномі людини було виявлено 11 генетичних локусів, які зумовлюють статистично вірогідний ризик спадкової схильності до розвитку кератоконуса [42]. Отримані нами дані можна розглядати як можливі кумулятивні ефекти між досліджуваними нами поліморфними варіантами генів IL6 та IL10 та виявленими в результаті метааналізу генами-кандидатами генетичного ризику розвитку кератоконуса.

Для дослідження такого кумулятивного модифікуючого впливу поліморфних варіантів генів IL6 та IL10 на клінічний фенотип у пацієнтів з іншою патологією рогівки і, зокрема, гратчастою дистрофією рогівки, ми провели дослідження поліморфізмів по цим генам у пацієнтів з даним діагнозом.

Спадкові дистрофії строми рогівки (зокрема, гратчаста дистрофія) є групою захворювань з аутосомно-домінантним типом успадкування, обумовлених мутаціями в гені TGFBI [43, 44]. Нами було проведено молекулярно-генетичне дослідження цих варіантів в групі пацієнтів з рецидивуючими ерозіями рогівки (56 осіб) та без еrozій в анамнезі (13 осіб). У цих пацієнтів раніше нами були визначені мутації в гені TGFBI, які є характерними саме для гратчастої дистрофії [45].

З метою виявлення можливої ролі мононуклеотидних замін -174G/C гена IL6 та -592C/A гена IL10, яка є нерівноважно зчепленою з досліджуваною нами раніше мононуклеотидною заміною -1082G/C гена IL10, в якості модифікаторів фенотипу у пацієнтів з гратчастою дистрофією строми рогівки, нами було проведено молекулярно-генетичне дослідження цих варіантів в групі пацієнтів з рецидивуючими еrozіями.

Отримані результати по розподілу генотипів в досліджуваних групах наведені в таблиці 4.

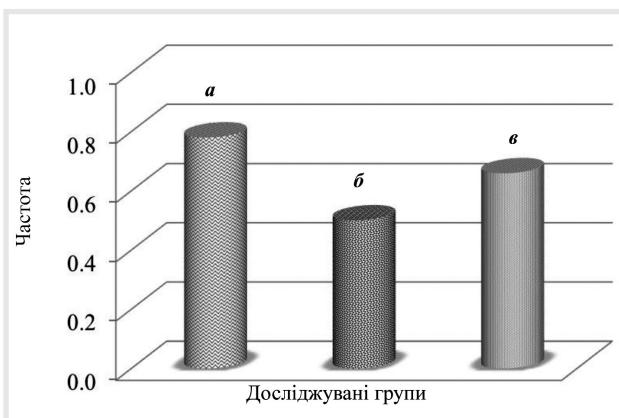
**Таблиця 3.** Частота розподілу генотипів та алеїв за поліморфізмом -174G/C гена *IL6* у індивідів з України та пацієнтів з діагнозом кератоконус.

Генотип	Контрольна група		Пацієнти з кератоконусом	
	Абсол. кількість	Частота	Абсол. кількість	Частота
GG	30	0,341	15	0,294
GC	39	0,443	27	0,529
CC	19	0,216	9	0,177
n	88		51	
Алель G	99	0,562	57	0,559
Алель C	77	0,438	45	0,441

В досліджуваній групі пацієнтів з еrozіями нами виявлено 9 індивідів (0,18) – гомозигот за поліморфним алелем -174C, асоційованим зі зниженою продукцією інтерлейкіну-6. Мажорним в досліджуваній групі, як і у популяційній вибірці, виявився гетерозиготний генотип -174GC (0,600). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з рецидивуючими еrozіями, обумовленими гратчастою дистрофією рогівки, свідчив про відхилення у розподілі генотипів від співвідношення Харді-Вайнберга ( $\chi^2=4,08$ ;  $p=0,04$ ). Виходячи з отриманого розподілу генотипів в дослідженій групі пацієнтів з еrozіями, можливо, що вони мають гетерозиготний генотип -174GC.

**Таблиця 4.** Розподіл генотипів та алеїв за мононуклеотидними замінами -174G/C гена *IL6*, -592C/A гена *IL10* у пацієнтів з рецидивуючими еrozіями та без них при гратчастій дистрофії строми рогівки.

Генотип / алеїль	Пацієнти з еrozіями	Пацієнти без еrozій	Популяційна група	
			Кількість (частота)	
<b>-174G/C ген <i>IL6</i></b>				
Загалом	50	12	88	
GG	11 (0,220)	6 (0,500)	30 (0,341)	
GC	30 (0,600)	4 (0,333)	39 (0,443)	
CC	9 (0,180)	2 (0,167)	19 (0,216)	
Алель G	52 (0,520)	16 (0,667)	99 (0,562)	
Алель C	48 (0,480)	8 (0,333)	77 (0,438)	
<b>-592C/A ген <i>IL10</i></b>				
Загалом	56	13	101	
CC	29 (0,518)	5 (0,385)	68 (0,673)	
CA	24 (0,429)	6 (0,462)	30 (0,297)	
AA	3 (0,054)	2 (0,153)	3 (0,030)	
Алель C	82 (0,732)	16 (0,615)	164 (0,820)	
Алель A	30 (0,268)	10 (0,385)	36 (0,180)	



**Рис. 4.** Розподіл частоти носіїв поліморфного алеля -174C гена IL6 серед пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки: а – пацієнтів з еrozіями; б – контрольної групи пацієнтів без еrozій; в – популяційної групи.

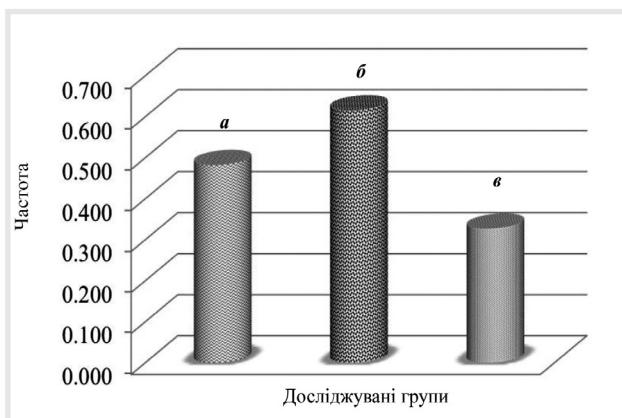
джуваній та двох контрольних групах, нами також був проведений розрахунок частот алелів за даним поліморфним варіантом. Ми встановили, що частота носіїв алеля -174C гена IL6 в контрольній популяційній групі (0,659) була достовірно ( $p<0,05$ ) нижчою порівняно з групою пацієнтів з еrozіями (0,780) (рис. 4).

Достовірних відмінностей з контрольною групою пацієнтів без еrozій встановити не вдалося, проте спостерігалася тенденція до зниження частоти носіїв алеля -174C в цій групі (0,500) порівняно з пацієнтами з еrozіями. Те, що ці відмінності не досягли достовірності, може бути частково обумовлено невеликим розміром групи пацієнтів без еrozії.

За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено розподіл генотипів за поліморфним алелем -592 C/A гена IL10 в досліджуваній та контрольній групах. В групі пацієнтів з рецидивуючими еrozіями рогівки, як і в популяційній групі переважав генотип, гомозиготний за алелем дикого типу -592 CC (0,518), тоді як в групі пацієнтів без еrozій мажорним генотипом виявився гетерозиготний -592CA (0,462). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з рецидивуючими еrozіями свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга ( $\chi^2=0,49$ ;  $p = 0,380$ ).

При порівнянні розподілу генотипів в досліджуваній та контрольній групах виявили статистично достовірне ( $p<0,05$ ) перевищення частки носіїв алеля -592A гена IL10 в групі пацієнтів з рецидивуючими еrozіями (0,483) порівняно з популяційною групою (0,327) (рис. 5).

Такі результати можна пояснити тим, що рецидивуючі еrozії відрізняються за ступенем супутнього запалення [34]. Морфологічною основою для виникнення рецидивуючих еrozій рогівки при гратчастій дистрофії є порушення адгезії базальних клітин епітелію до бо-



**Рис. 5.** Розподіл частоти носіїв поліморфного алеля -592A гена IL10 серед пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки: а – пацієнтів з еrozіями; б – контрольної групи пацієнтів без еrozій; в – популяційної групи.

ументової мембрани внаслідок накопичення між цими структурами патологічних депозитів амілоїду, а також вторинних дегенеративних змін в передніх шарах рогівки [46]. Пошкодження епітелію є пусковим механізмом запальній реакції при гратчастій дистрофії рогівки.

Відомо, що регенерація рогівки – це комплексна відповідь організму, успіх і синхронізація якої залежать від правильної комбінації цитокінів і факторів росту, що експресуються в певні проміжки часу [34, 47, 35]. Прозапальні цитокіни беруть участь в регуляції проліферації клітин рогівки і деградації як некротизованих клітин, так і денатурованого колагену [36, 48]. Протизапальні цитокіни забезпечують видалення клітин запалення, запобігаючи, таким чином, подальшому виразковому процесу, плавленню та неоваскуляризації рогівки [34, 47].

В ураженому епітелії рогівки спостерігається експресія генів двох основних цитокінів гострої фази запалення IL1B і IL6, а також хемокіну IL8 і гена протизапального цитокіну IL10 [36, 49]. Білки, які кодуються цими генами, виявляються в слізозій рідині при пошкодженні тканин рогівки. Показано, що вони відіграють ключову роль в регенерації рогівки [37]. Можемо припустити, що у пацієнтів з гратчастою дистрофією рогівки ступінь запальної реакції, що виникає при рецидивуючій еrozії, знаходиться під контролем генів-модифікаторів.

### Заключення

Підсумовуючи одержані дані, зазначимо, що нами вперше було проаналізовано розподіл генотипів за алельними варіантами -174G/C гена IL6, -592C/A гена IL10 у пацієнтів з кератоконусом та з рецидивуючими еrozіями при гратчастій дистрофії рогівки. Встановлено, що алельні варіанти -174C гена IL6 та -592A гена IL10 є вірогідними модифікаторами ступеня запального процесу у пацієнтів з гратчастою дистрофією стро-

ми рогівки та ймовірними генетичними маркерами ризику розвитку рецидивуючих ерозій рогівки у таких пацієнтів.

Серед хворих з кератоконусом вперше виявлено тенденція в збільшенні частоти гомозигот (AA) за IL10 1800896 (0,25) і зменшенні частоти гомозигот (CC) за поліморфним локусом -174G/C гена IL6 (0,18) у порівнянні з частотою індивідів контрольної групи (0,19 та 0,22 відповідно), однак отримані дані не досягли порогу значущості. Враховуючи мультіфакторність патогенезу кератоконуса, для статистично вірогідного підтвердження даних потрібно істотне збільшення групи.

Таким чином, нами отримано ще одне підтвердження, що поліморфні варіанти -174G/C гена IL6, -592C/A та -1082G/C гена IL10 створюють кумулятивний ефект разом з генами-детермінаторами патологічних процесів в рогівці.

## Література

- Kennedy, R.H., Bourne, W.M., Dyer, J.A.** A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus // Am. J. Ophthalmol. – 1986. – Vol.101. – P.267–273.
- Дронов М.М.** Кератоконус (виды, этиология, патогенез). Часть I / М.М. Дронов, Ю.И. Пирогов // Офтальмохирургия и терапия. – 2002. – №2. – С. 33–37.
- Севостьянов Е.Н.** Кератоконус (этиология, патогенез, медикаментозное лечение): учебное пособие / Е.Н. Севостьянов, Е.Н. Горская, В.Ф. Экгардт. – Челябинск: УГМАДО, 2005. – 32 с.
- Бирич Т.А.** Результаты лечения больных с кератоконусом / Т.А. Бирич, А.Ю. Чекина, Н.И. Аксенова // Офтальмология Беларуси. – 2010. – №1 (4).
- Nowak D.M.** The genetics of keratoconus / D.M. Nowak, M. Gajecka // Middle East Afr. J. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 18, No.1. – P. 2-6.
- Karimian F., Aramesh S., Rabei H.M. et al.** Topographic evaluation of relatives of patients with keratoconus // Cornea. – 2008. – Vol.27. – P.874–878.
- Owens H., Gamble G.** A profile of keratoconus in New Zealand // Cornea. – 2003. – Vol.22. – P.122–125.
- Aknin C., Allart J.F., Rouland J.F.** Unilateral keratoconus and mirror image in a pair of monozygotic twins] // J. Fr. Ophthalmol. – 2007. – Vol.30. – P.899–902.
- Weed K.H., MacEwen C.J., McGhee C.N.** The variable expression of keratoconus within monozygotic twins: dundee University Scottish Keratoconus Study (DUSKS) // Cont Lens Anterior Eye. – 2006. – Vol.29. – P.123–126.
- Schmitt-Bernard C., Schneider C.D., Blanc D., Arnaud B.** Keratographic analysis of a family with keratoconus in identical twins // J. Cataract Refract Surg. – 2000. – Vol.26. – P.1830–1832.
- Parker J., Ko W.W., Pavlopoulos G., Wolfe P.J., Rabinowitz Y.S. et al.** Videokeratography of keratoconus in monozygotic twins // J Refract Surg. – 1996. – Vol.12. – P.180–183.
- Hughes A.E., Dash D.P., Jackson A.J., Frazer D.G., Silvestri G.** Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2003. – Vol.44. – P.5063–5066.
- Rabinowitz Y.S.** The genetics of keratoconus // Ophthalmol Clin North Am. – 2003. – Vol.16. – P.607–620.
- Wheeler J.** The Genetics of Keratoconus: A Review / J. Wheeler [et al.] // Reprod. Syst. Sex. Disord. – 2012. – Vol. 3, No.6.
- Dimasi D.P., Burdon K.P., Craig J.E.** The genetics of central corneal thickness // Br J Ophthalmol. – 2010. – Vol.94. – P.971–976.
- Pedersen U., Bramsen T.** Central corneal thickness in osteogenesis imperfecta and otosclerosis // ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. – 1984. – Vol.46. – P.38–41.
- Evereklioglu C. et al.** Central corneal thickness is lower in osteogenesis imperfecta and negatively correlates with the presence of blue sclera // Ophthalmic Physiol Opt. – 2002. – Vol.22. – P.511–515.
- Cohen E.J.** Keratoconus and normal-tension glaucoma: a study of the possible association with abnormal biomechanical properties as measured by corneal hysteresis (An AOS Thesis) // Trans Am Ophthalmol Soc. – 2009. – Vol.107. – P.282–99.
- Gordon M.O. et al.** The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma // Arch Ophthalmol. – 2002. – Vol.120. – P.714–720.
- Cornes B.K. et al.** Identification of four novel variants that influence central corneal thickness in multi-ethnic Asian populations // Hum Mol Genet. – 2012. – Vol.21. – P.437–445.
- Lu Y. et al.** Common genetic variants near the Brittle Cornea Syndrome locus ZNF469 influence the blinding disease risk factor central corneal thickness // PLoS Genet. – 2010. – Vol.6: e1000947.
- Vitart V. et al.** New loci associated with central cornea thickness include COL5A1, AKAP13 and AVGR8 // Hum Mol Genet. – 2010. – Vol.19. – P.4304–4311.
- Vithana E.N. et al.** Collagen-related genes influence the glaucoma risk factor, central corneal thickness // Hum Mol Genet. – 2011. – Vol.20. – P.649–658.
- Burdon K.P., Macgregor S., Bykhovskaya Y., Javadiyan S. et al.** Association of Polymorphisms in the Hepatocyte Growth Factor Gene Promoter with Keratoconus // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2011. – IOVS, October 2011. – Vol. 52, No. 11. – P.8514–8519
- Chwa M., Atilano S.R., Reddy V., Jordan N. et al.** Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2006. – Vol.47. – P.1902–1910.
- Balasubramanian S.A., Mohan S., Pye D.C., Willcox M.D.** Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus // Acta Ophthalmol. – 2012. – Vol.90. – e303–e309.
- Lema I., Duran J.A.** Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus // Ophthalmology. – 2005. – Vol.112. – P.654–659.
- Lema I., Sobrino T., Duran J.A., Brea D., Diez-Feijoo E.** Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears // Br J Ophthalmol. – 2009. – Vol.93. – P.820–824.
- Nemet A.Y., Vinker S., Bahar I., Kaiserman I.** The association of keratoconus with immune disorders // Cornea. – 2010. – Vol.29. – P.1261–1264.
- Wisse R.P., Kuiper J.J., Gans R. et al.** Cytokine expression in keratoconus and its corneal microenvironment: a systematic review // Ocular Surf. – 2015. – Vol.13. – P.272–283.
- Jun A.S., Cope L., Speck C. et al.** Subnormal cytokine profile in the tear fluid of keratoconus patients // PLoS One. – 2011. – Vol.6. – e16437.

32. **Temple S.** Alleles carried at positions -819 and -592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae* / S. Temple, E. Lim, K. Cheong [et al.] // Immunogenetics. – 2003. – Vol. 55, № 9. – P. 629–632.
33. **Costa G.C.** Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy / G.C. Costa, M.O. da Costa Rocha, P.R. Moreira [et al.] // J. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 199, № 3. – P. 451–454.
34. **Agrawal V.B.** Corneal epithelial wound healing / Vinay B. Agrawal, Ray J. Tsai // Indian J. Ophthalmol. – 2003. – Vol. 51, № 1. – P. 5–15.
35. **Wilson S.E.** The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells / S.E. Wilson, R.R. Mohan, R. Ambrósio [et al.] // Prog. Retin. Eye Res. – 2001. – Vol. 20. – P. 625–637.
36. **Ebihara N.** Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing / N. Ebihara, A. Matsuda, S. Nakamura [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 52, № 12. – P. 8549–8557.
37. **Sotozono C.** Cytokine expression in the alkali-burned cornea / C. Sotozono, J. He, Y. Matsumoto [et al.] // Curr. Eye Res. – 1997. – Vol. 16, № 7. – P. 670–676.
38. **Ferrari S.L.** Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women / S.L. Ferrari, L. Ahn-Luong, P. Garnero [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 88, № 1. – P. 255–259.
39. **Fishman D.** The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis / D. Fishman, G. Faulds, R. Jeffery [et al.] // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 102, № 7. – P. 1369–1376.
40. **Kristiansen O.** Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females / O. Kristiansen // Hum. Mol. Genet. – 2003. – Vol. 12, № 10. – P. 1101–1110.
41. **Kucherenko A. M., Pampukha V. M., Drozhzhyna G. I., Livshits L. A.** IL1 $\beta$ , IL6 and IL8 gene polymorphisms in-  
volvement in recurrent corneal erosion in patients with hereditary stromal corneal dystrophies // Цитология і генетика. – 2013. – Vol.47, No. 3. – P.42–45.
42. **Yi Lu, Veronique Vitart, Kathryn P Burdon et.al** Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus // Nat Genet. – 2013. – Feb; 45(2). – P.155–163.
43. **Aldave A.** The genetics of the corneal dystrophies / A. Aldave // Dev. Ophthalmol. – 2011. – Vol. 48. – P. 51–66.
44. **Kannabiran C.** TGFBI gene mutations in corneal dystrophies / Chitra Kannabiran, Gordon Clintworth [et al.] // Hum. Mutat. – 2006. – Vol. 27, № 7. – P. 615–625.
45. **VM Pampukha, GI Drozhyna, LA Livshits** TGFBI gene mutation analysis in families with hereditary corneal dystrophies from Ukraine // Ophthalmologica. – 2004. – Vol.218 (6). – P.411-414.
46. **Weidle E.** Epithelial and stroma corneal dystrophies / E. Weidle // Ophthalmologe. – 1996. – Vol. 93, № 6. – P. 754–767.
47. Reinach P. The corneal epithelium: clinical relevance of cytokine-mediated responses to maintenance of corneal health / Peter Reinach, Kathryn S. Pokorny // Arq. Bras. Oftalmol. – 2008. – Vol. 71, № 6 Suppl. – P. 80–86.
48. **Hong J.W.** Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea / J.W. Hong, J.J. Liu, J.S. Lee [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2001. – Vol. 42, № 12. – P. 2795–2803.
49. **Torres P.** The role of cytokines in corneal immunopathology / Paulo Torres, Aize Kijlstra // Ocul. Immunol. Inflamm. – 2001. – Vol. 9, № 1. – P. 9–24.

Автори засвідчують про відсутність конфлікту інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Поступила 15.01.2020

## Роль полиморфных вариантов генов -174 G/C IL6 и -592C/A IL10 в патогенезе кератоконуса и развитии рецидивирующих эрозий при решетчатой дистрофии роговицы у пациентов из Украины

Лившиц Л.А., Дрожжина Г.И., Кучеренко А.М., Ивановская О.В., Гайдамака Т.Б., Городна А.В., Середа Е.В.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины; Киев (Украина)

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова АМН Украины»; Одесса (Украина)

**Введение.** Кератоконус (КК), эктазия роговицы, – мультифакторное заболевание с наследственной предрасположенностью, которое встречается у 1:2000 населения. Решетчатая дистрофия стромы роговицы – наиболее распространенный тип (40,2%) среди других видов наследственных дистрофий в Украине – моногенных заболеваний, обусловленных мутациями в гене *TGFBI* с

варьирующими клиническими проявлениями фенотипа.

**Цель.** Целью нашей работы было выяснить роль полиморфных вариантов генов -174 G/C IL6 и -592G/A и -592C/A IL10 как факторов наследственной предрасположенности к развитию кератоконуса и рецидивирующих эрозий у пациентов с решетчатой дистрофией роговицы из Украины.

**Материал и методы.** Офтальмологическое ис-

следование проводили с использованием биомикроскопии, офтальмоскопии, кератотопографии, пахиметрии, дистанционной биометрии, гониоскопии, тонометрии. Генотипирование полиморфных вариантов генов -174G/C IL6, -1082G/A и -592C/A IL10 проводили с использованием анализа рестрикции фрагментов ПЦР продуктов, в состав которых входила последовательность ДНК соответствующих полиморфных локусов. Для статистического анализа использовали Fexact-тест.

**Результаты.** Установлено, что частота гомозигот (AA) по IL10 rs1800896 была выше у больных с КК (0,25) по сравнению с частотой таких индивидов в контрольной группе (0,19). Частота гомозигот (CC) среди больных с кератоконусом (0,18) по полиморфному локусу -174G/C гена IL6 была ниже по сравнению с частотой индивидов с таким генотипом в контрольной группе (0,22). Полученные данные не достигают

порога значимости, но указывают на тенденцию к ассоциации полиморфных вариантов -1082G/A IL10 и -174G/C гена IL6 с риском развития кератоконуса. В свою очередь, частота носителей аллеля С гена IL6 у пациентов с решетчатой дистрофией и рецидивирующими эрозиями (0,78) была достоверно выше ( $p<0,05$ ), чем среди индивидов из контрольной группы (0,66). Также в группе пациентов с решетчатой дистрофией с рецидивирующими эрозиями частота (0,48) носителей аллеля А гена IL10 rs1800872 достоверно ( $p<0,05$ ) превышала долю носителей этого аллеля (0,33) в контрольной группе.

**Заключение.** По результатам проведенных исследований установлено, что полиморфизмы -174G/C гена IL6, -592C/A rs1800872 и -1082G/A rs1800896 гена IL10 вместе с генами-детерминаторами создают кумулятивный эффект модификаторов клинического фенотипа при кератоконусе и решетчатой дистрофии роговицы.

**Ключевые слова:** кератоконус, решетчатая дистрофия роговицы, рецидивирующие эрозии, клинический фенотип, полиморфизм генов интерлейкинов, наследственная предрасположенность