

DOI: <https://doi.org/10.25276/0235-4160-2020-1-6-13>
УДК 575:617.713

Изучение ассоциации с кератоконусом однонуклеотидных вариантов в гене *COL5A1* и прилегающем межгенном пространстве в когорте пациентов из России

Л.О. Скородумова¹, А.В. Белодедова², Е.С. Захарова¹, Е.И. Шарова¹, М.М. Бикбов³,
Э.Л. Усубов³, О.П. Антонова², Б.Э. Малюгин²

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»;

² ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России;

³ ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней АН Республики Башкортостан»

РЕФЕРАТ

Цель. Выявить ассоциацию с кератоконусом маркеров вблизи гена *COL5A1* и в его интроне. Изучить взаимосвязь наличия маркерной аллели с уровнем экспрессии гена *COL5A1* в роговице пациентов с кератоконусом.

Материал и методы. В исследование было включено 70 пациентов с диагнозом «кератоконус», а также 100 участников контрольной группы. Все участники были генотипированы по двум маркерам, ассоциированным с кератоконусом: rs1536482 и rs7044529. Проведен расчет диагностических показателей для оценки возможности использования маркеров в качестве классификаторов кератоконуса. У пациентов с кератоконусом, которым была выполнена кератопластика, были собраны образцы роговицы (n=9) для выделения РНК. Проведено сравнение уровня экспрессии гена *COL5A1* в группе образцов роговицы пациентов с хотя бы одной маркерной аллелью (rs1536482+) и группе образцов без маркерных аллелей (rs1536482-) с помощью ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией.

Офтальмохирургия. 2020;1: 6–13.

Результаты. Было выявлено значимое различие в частоте встречаемости маркерной аллели rs1536482 между группой пациентов с кератоконусом и контрольной группой ($p=0,0004$, критерий Фишера). Хотя бы одна маркерная аллель rs1536482 была обнаружена у 67,1% пациентов (чувствительность маркера) с кератоконусом и 46% участников контрольной группы. Таким образом, специфичность маркера является низкой (0,54). Отношение шансов составило 2,4, а отношение рисков – 1,69. Анализ экспрессии генов в роговице пациентов не выявил ассоциации уровня экспрессии гена *COL5A1* с генотипом ($p=0,9$, критерий Манна-Уитни).

Выводы. В данном исследовании была выявлена ассоциация rs1536482 с кератоконусом в выборке пациентов из России. Однако в связи с низкой специфичностью данного маркера он не может быть использован в качестве классификатора кератоконуса. Наличие маркерной аллели не ассоциировано с уровнем экспрессии гена *COL5A1*.

Ключевые слова: кератоконус, *COL5A1*, генетические маркеры, диагностика. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

ABSTRACT

Association of single nucleotide variants in the *COL5A1* gene and adjacent intergenic space with keratoconus in a cohort of patients from Russia

L.O. Skorodumova¹, A.V. Belodedova², E.S. Zakharova¹, E.I. Sharova¹, M.M. Bikbov³, E.L. Usubov³, O.P. Antonova², B.E. Malyugin²

¹ The Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency;

² The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation;

³ The Ufa Eye Research Institute of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan

Purpose. To assess an association of markers near the *COL5A1* gene and in its intron with keratoconus. To study the relationship between the presence of marker alleles and the level of expression of the *COL5A1* gene in the cornea of patients with keratoconus.

Material and methods. The study included 70 patients diagnosed with keratoconus, and 100 participants of the control group. All participants were genotyped for two markers associated with keratoconus: rs1536482 and rs7044529. The diagnostic indicators were calculated



to assess a possibility of application of these markers as a keratoconus classifiers. In patients with keratoconus who underwent keratoplasty, corneal samples (n=9) were collected to isolate the RNA. The *COL5A1* gene expression level was compared between the group of patient corneal samples with at least one marker allele (rs1536482 +) and the group of samples without marker alleles (rs1536482-) using real-time PCR coupled with reverse transcription.

Results. A significant difference of the rs1536482 marker allele occurrence was found between the group of keratoconus patients and the control group ($p=0.0004$, Fisher test). At least one marker allele rs1536482 was found in 67.1% of patients (marker sensitivity) with keratoconus and in 46% of control group participants. Thus, the specificity

of the marker is low (0.54). The odds ratio was 2.4, and the risk ratio was 1.69. Gene expression analysis in the keratoconus patients' cornea did not reveal an association of the *COL5A1* gene expression level with the genotype ($p=0.9$, Mann-Whitney test).

Conclusion. In this study, an association of rs1536482 with keratoconus was identified in a cohort of patients from Russia. However, due to the low specificity of this marker, it cannot be used as a keratoconus classifier. The presence of a marker allele is not associated with the *COL5A1* gene expression level.

Key words: *keratoconus, COL5A1, genetic markers, diagnosis.* ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. 2020;1: 6–13.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Кератоконус – хроническое прогрессирующее дистрофическое заболевание роговицы, характеризующееся её истончением, растяжением, конусовидным выпячиванием [1]. Несмотря на неоднородность распространения и относительно невысокую частоту встречаемости кератоконуса в популяции (от 0,009% в Японии до 3,3% в Ливане), изучение данного заболевания актуально в связи с тем, что оно затрагивает наиболее социально активную часть населения и при отсутствии своевременного специфического хирургического лечения приводит к прогрессирующему снижению остроты зрения и инвалидизации пациента [2, 3].

Диагностика кератоконуса на ранних стадиях заболевания с помощью стандартных методов исследований и рутинного осмотра практически не возможна. Специализированное диагностическое оборудование, позволяющее обнаружить кератоконус на ранних и субклинических стадиях заболевания, предусмотрено лишь в крупных диагностических центрах, куда зачастую направляют пациентов уже с выраженными признаками прогрессии. Повышение интереса к диагностике кератоконуса обусловлено также растущей частотой лазерных рефракционных вмешательств по поводу близорукости и астигматизма у мо-

лодых пациентов, что существенно повышает риск реактивного развития кератоконуса [4–6]. Таким образом, в настоящее время ведется активная работа по разработке диагностики раннего кератоконуса не только с помощью клинико-функциональных, но и молекулярно-генетических методов.

Исследование кератоконуса у моно- и дизиготных близнецов показало, что развитие кератоконуса обусловлено генетическими факторами [6, 8, 9]. Зарубежными исследователями были проведены многочисленные исследования семейных и спорадических случаев кератоконуса с целью выявления генетических причин развития данного вида патологии глаза [10, 11]. Было выяснено, что частота встречаемости вариантов, ассоциированных с кератоконусом, может варьировать между популяциями [12]. В России к настоящему времени было проведено только одно исследование вариантов в выборке пациентов с кератоконусом. Авторы проанализировали последовательность гена *SOD1* у пациентов с кератоконусом с целью поиска вариантов [9]. Таким образом, изучение генетических вариантов, ассоциирующихся с кератоконусом, может рассматриваться как актуальный для системы здравоохранения в РФ [14].

В результате изучения однонуклеотидных вариантов (single nucleotide variants – SNV), ассоциирующихся с центральной тол-

щиной роговицы (central corneal thickness – CCT), с помощью полногеномных исследований ассоциаций (genome-wide association studies – GWAS) на выборке европеоидных и азиатских популяций была обнаружена ассоциация с вариантами rs1536482 рядом с геном *COL5A1* и rs7044529 в интроне гена *COL5A1* [15–18]. CCT является наследуемым признаком, а ее снижение – фактором риска развития глаукомы, кератоконуса и синдрома хрупкой роговицы. Ассоциация rs1536482 и rs7044529 с кератоконусом была выявлена по результатам генотипирования выборки пациентов из Австралии и Северной Ирландии ($OR=1,32$, $p=1,2E-05$ и $OR=1,34$, $p=3,0E-04$ соответственно) [17]. В выборке европеоидных пациентов из США при анализе вариантов, расположенных на расстоянии 300 кБ с двух сторон от *COL5A1*, подтвердилась ассоциация с кератоконусом только rs1536482 ($OR=1,30$, $p=6,5E-03$) [19]. Ассоциация rs1536482 и rs7044529 с кератоконусом не воспроизвелась на независимой выборке пациентов из Австралии [20]. Также ассоциация rs1536482 не подтвердилась на выборке из Чехии [21].

Ген *COL5A1* кодирует альфа 1 цепь коллагена V типа (collagen type V

Для корреспонденции:

Белодедова Александра Владимировна,
аспирант
ORCID ID: 0000-0002-2970-4007
E-mail: ale.belodedova@gmail.com

alpha 1 chain). Коллаген V типа составляет 10–20% от всего коллагена в роговице [22]. Он встраивается в фибриллы, состоящие из коллагена I, II и III типа, регулируя их толщину [23]. Мутации в гене *COL5A1* приводят к развитию синдрома Элерса-Данлоса [24, 25]. У пациентов с данным заболеванием отмечалось уменьшение толщины роговицы и снижение плотности коллагеновых фибрилл [22]. Сходные изменения наблюдаются и при кератоконусе [26–28]. Всё это свидетельствует в пользу ассоциации маркеров в гене *COL5A1* с кератоконусом.

ЦЕЛЬ

Провести генотипирование вариантов rs1536482 и rs7044529 в российской выборке пациентов и участников контрольной группы с целью анализа ассоциации данных вариантов с кератоконусом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Этические положения

Исследование было одобрено Локальными этическими комитетами ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России и Уфимского НИИ глазных болезней и проводилось в соответствии с положениями Хельсинкской декларации.

Пациенты с кератоконусом

На базе ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России и Уфимского НИИ глазных болезней в исследование включались пациенты с подтвержденным диагнозом «кератоконус» – 70 чел. Всем пациентам было проведено клиническое и функциональное обследование, включавшее визометрию без коррекции (НКОЗ) и с коррекцией, офтальмометрию, периметрию, тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, эндотелиальную микроскопию, кератотопографию, оптическую когерентную томографию (ОКТ). Био-

микроскопию переднего отрезка глаза проводили с использованием щелевой лампы модели «SL-30» (Opton, Германия).

При осмотре роговицы отмечали асферичность ее поверхности, наличие истончения и стрий Фогта, кольца Фляйшера, наличие складок десцеметовой мембраны, а также фиброзных изменений в слоях стромы. По данным ОСТ «Visante OCT» (Carl Zeiss, Германия) определяли толщину роговицы во всех ее участках (пахиметрическая карта), наличие рубцов. По данным кератотопографии с прибора «EMS-4» (Tomey, Япония) определяли наличие и величину астигматизма, данные минимальной и максимальной кератометрии, правильность астигматизма, индекс асимметрии и индекс асферичности поверхности. При анализе результатов кератотопографии отмечали наличие паттерна неправильного астигматизма, а также повышение индекса асимметрии поверхности и индекса регулярности поверхности (более 1). Данные показатели в сочетании с центральной толщиной менее 480 мкм, а также невозможностью скорректировать остроту зрения до 1,0 были критически важны для дифференциальной диагностики ранних стадий. Стадия кератоконуса определялась в соответствии с классификацией Амслера-Крумейха. В исследование включались пациенты с 1 стадией. Пациенты с субклиническим кератоконусом исключались. Пациенты имели следующие стадии: 1 стадия – n=3, 1–2 стадия – n=3, 2 стадия – n=11, 2–3 стадия – n=20, 3 стадия – n=22, 3–4 стадия – n=7, 4 стадия – n=4. Пациенты с системными заболеваниями или синдромами (например, синдромом Дауна), у которых кератоконус был одним из симптомов, были исключены. Все пациенты были европейского происхождения, но из разных этнических групп, преимущественно русских (n=35) и татар (n=25). Остальными участниками группы кератоконуса были армяне (n=4), башкиры (n=4), удмурты (n=2), северокавказские народно-

сти (n=3), азербайджане (n=2) и маорийцы (n=1).

Части пациентов, включенных в исследование, была также проведена операция кератопластики. Толщина роговицы менее 350 мкм (3–4 стадия) являлась прямым показанием к проведению передней глубокой послойной кератопластики (ГППК), при наличии невысоких показателей НКОЗ, и прогрессии, а также невозможности или непереносимости коррекции. При толщине роговицы более 350 мкм ГППК проводилась в случае наличия прогрессирующего кератоконуса даже после проведения кроссликинга роговичного коллагена. Сквозную кератопластику проводили в случае наличия показаний таких же, как и для ГППК, но в сочетании с невозможностью ее проведения вследствие наличия рубцов десцеметовой мембраны.

Контрольная группа

В контрольную группу включались пациенты, которые обращались в ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России и Уфимский НИИ глазных болезней для проведения фактоэмульсификации катаракты и имплантации интраокулярной линзы (100 чел.). Пациенты с тяжелыми сопутствующими заболеваниями (глаукома, миопия средней и высокой степени, дистрофия сетчатки или роговицы) исключались. Допустимыми сопутствующими заболеваниями были миопия слабой степени и псевдоэкзофалиативный синдром. Все пациенты были старше 50-ти лет для исключения возможности поздней манифестации кератоконуса. Пациенты, включенные в контрольную группу, были европейского происхождения (European descent). Распределение по национальностям было следующим: русские – n=59, татары – n=35, башкиры – n=3, северокавказские народности – n=3.

Биологические образцы

У пациентов с кератоконусом, включенных в исследование, и участников контрольной группы были собраны образцы веноз-

Таблица 1

Праймеры, использованные для генотипирования участников исследования

Table 1

Primers used for participants genotyping

Название варианта Variant ID	Геномные координаты ампликона (сборка GRCh38) Amplicon genomic coordinates (GRCh38 assembly)	Последовательность праймеров 5'>3' Primer sequence 5'>3'	Длина ампликона Amplicon length
rs1536482	Chr:9 134548546-134549175	AGGTCCTTGAGCCCTTTTA	630
		TCACCTGAGCCTCCTCATCG	
rs7044529	Chr:9 134675934-134676408	ACAAAGCCACCTTGATTAA	475
		TGCCAAATATGCTGCAGAGG	

ной крови в пробирки «Vacutainer» (Becton, Dickinson and Company, США) с ЭДТА (4–6 mL). Образцы крови хранились при -20° C до выделения ДНК.

У пациентов с кератоконусом, которым была проведена кератопластика (ТППК) в ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова» Минздрава России, собирались послеоперационные образцы роговицы. В образец входили: эпителий роговицы, боуменова мембрана и строма. Стабилизацию РНК в образцах роговицы обеспечивали немедленным погружением их в раствор «RNA Later» (ThermoFisher Scientific, США). Далее образцы выдерживались при +4° C в течение 16 часов, затем хранились при -20° C до выделения РНК.

Выделение нуклеиновых кислот

ДНК была выделена из образцов венозной крови с помощью набора «Gentra Puregene Blood Kit» (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

РНК из роговицы выделяли с использованием «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, Германия). Образцы роговицы измельчали и переносили в пробирку объемом 2 мл с лизирующим буфером RLT (с добавлением бета-меркаптоэтанола) и одним 5-мм шариком из нержавеющей стали. Для разрушения и гомогенизации пробирку с роговицей, буфером для лизиса и шариком встряхивали в течение 1 минуты при мак-

симальной скорости (30 Гц) в приборе «Tissue Lyser II» (Qiagen, Германия). Следующие этапы выделения РНК осуществляются в соответствии с протоколом производителя для образцов ткани. Прибор «Qubit 2» (Invitrogen, США) и набор для анализа РНК «Qubit RNA HS Assay Kit» (ThermoFisher Scientific, США) использовали для оценки концентрации РНК.

Генотипирование

Специфичные праймеры к участкам интереса были подобраны с использованием программы «Primer-BLAST» (NCBI NIH, США; табл. 1).

Генотипирование SNV проводили с использованием набора «Gene Pak PCR MasterMix Core» (IsoGene Lab. Ltd., Россия) в следующих условиях: объем реакции – 20 мкл, ДНК – 50 нг и конечная концентрация праймера – 0,3 нМ каждый. Контрольный образец, который содержал все реагенты, но не содержал ДНК, включался каждый раз, когда смешивали реагенты для ПЦР для каждой пары праймеров. Продукты анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Требовалось отсутствие сигнала в контрольной реакции без ДНК, продукты ПЦР должны были соответствовать расчетному размеру ампликона. При выполнении этих условий образцы направлялись для секвенирования по Сэнгеру. Для этого использовали набор «BigDye Terminator v3.1» (ThermoFisher Scientific, США) в со-

ответствии с протоколом производителя. Секвенирование проводили на капиллярном анализаторе «ABI Prism 3730XL» (Applied Biosystems Inc, США). Файлы секвенирования ABI были проанализированы в программе Unipro UGENE.

Исследование экспрессии гена COL5A1

Следы ДНК в образцах РНК были удалены с помощью набора «DNAfree TURBO kit» (ThermoFisher Scientific, США). Обратную транскрипцию выполняли с использованием случайных декамерных праймеров (Евроген, Россия) и набора для обратной транскрипции «SuperScript IV Reverse Transcription Kit» (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Каждая реакция обратной транскрипции содержала 40 нг тотальной РНК, конечная концентрация случайных декамеров 2,5 мкМ. Для каждого образца было две пробирки – с добавленной транскриптазой (RT +) и без (RT -).

Праймеры и гидролизные пробы, специфичные для транскриптов COL5A1 (NM_000093.4 и NM_001278074.1) и транскриптов RPL13A (NM_012423.4) были подобраны и проверены на специфичность с использованием «Primer-BLAST». Прямой праймер COL5A1: GCCTGGTCCAAAAGGTGCTA; обратный праймер COL5A1: GTCCACGTAGTTCTCGCCAT; гидролизный зонд COL5A1: FAM-

Таблица 2

Демографические данные группы пациентов с кератоконусом и контрольной группы

Table 2

Demographic characteristics of the keratoconic patients and control groups

Параметр Parameter	Пациенты с кератоконусом (n=70) Keratoconic patients (n=70)		Контрольная группа (n=100) Control group (n=100)	
	мужчины males	женщины females	мужчины males	женщины females
Количество Number	50	20	57	43
Средний возраст (SD) Mean age (SD)	30,3 (11,1)	32,8 (11,1)	60,3 (9,0)	72,9 (9,3)
	31,0 (11,1)		61,4 (9,6)	

TCCTCGGGTCCAACTGGCCGAAG-BHQ1. Прямой праймер RPL13A: CACCGCCCTACGACAAGAA; обратный праймер RPL13A: TTTCTGTAGGCTTCAGACGCA; гидролизный зонд RPL13A: VIC-TGGTGGTTCCTGCTGCCCTCAAGGTC-BHQ1. ПЦР проводили с использованием реактивов «TaqMan Fast Advanced Master Mix» (ThermoFisher Scientific, США) и амплификатора для ПЦР в реальном времени «QuantStudio 5» (ThermoFisher Scientific, США). Реакция ПЦР содержала 2 мкл кДНК, конечная концентрация каждого праймера – 150 нМ, конечная концентрация каждого зонда – 75 нМ. ПЦР проводили в трех репликатах для каждого образца кДНК (для RT + и для RT-), для каждой смеси реагентов были включены три контрольных образца без ДНК. Условия реакции были следующими: 50° С – 2 минуты, 95° С – 5 минут, далее 45 циклов денатурации при 95° С в течение 15 с, отжиг при 64° С в течение 15 с, элонгации при 72° С в течение 30 с. Регистрацию уровня флуоресценции проводили на стадии элонгации. Далее для анализа результатов использовалась программа «QuantStudio Design and Analysis Software v1.4.3» (ThermoFisher Scientific, США).

Статистическая обработка данных

Для проверки нулевой гипотезы использовался двусторонний критерий Фишера в программе «Prism

7» (GraphPad Software, США). Нулевой гипотезой было, если разница в встречаемости аллелей генотипов между группой пациентов с кератоконусом и контрольной группой случайна. Встречаемость считалась неслучайной при $p < 0,05$. Для анализа генотипов была рассмотрена доминантная модель наследования кератоконуса. В связи с этим положительным результатом наличия сигнала было наличие хотя бы одной маркерной аллели. Двусторонний критерий Фишера также использовался для анализа ассоциации между наличием сигнала и полом, а также со стадией заболевания. Если у пациента стадия по Амслеру-Крумейху различалась между глазами, то для расчетов использовалось наибольшее значение.

Для проверки нулевой гипотезы об отсутствии различия в уровне экспрессии целевого гена в образцах роговицы пациентов с кератоконусом и образцов доноров (контрольная группа) использовался метод вычисления $\Delta\Delta Ct$. RPL13A был взят в качестве референсного гена, а COL5A1 – в качестве целевого гена. Для этого вычисляли разницу между Ct целевого гена и Ct референсного гена в каждом репликате (ΔCt), затем вычисляли среднее ΔCt между репликатами одного образца. Для статистической нулевой гипотезы об отсутствии различий в значении ΔCt в группах применяли непараметрический тест U-критерий

Манна-Уитни. Нулевая гипотеза отклонялась при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Демографические данные участников исследования

В исследование было включено 70 пациентов со спорадическим ($n=57$) или семейным ($n=13$) кератоконусом и 100 участников контрольной группы без кератоконуса (табл. 2).

Генотипирование однонуклеотидных вариантов s1536482 и rs7044529 и расчет их ассоциации с кератоконусом

Все группа пациентов с кератоконусом ($n=70$) и все участники контрольной группы ($n=100$) были генотипированы по двум SNV, ассоциированным с кератоконусом: rs1536482, находящимся рядом с геном COL5A1, и rs7044529, расположенным в интроне гена COL5A1. Распределение генотипов в группе кератоконуса и контрольной группе приведено в табл. 3.

При проверке нулевой гипотезы о том, что разница в частоте встречаемости маркерной аллели в группе кератоконуса и контрольной группе является случайной, только для rs1536482 нулевая гипотеза могла быть отвергнута (табл. 4 и 5). Таким образом, в российской выборке пациентов с кератоконусом была подтверждена ассоциация с rs1536482.

Таблица 3

Результаты генотипирования пациентов с кератоконусом и участников контрольной группы по маркерам rs1536482 и rs7044529

Table 3

The rs1536482 and rs7044529 markers genotyping results in keratoconic patients and control group participants

Название варианта Variant ID	Генотип Genotype	Число пациентов с кератоконусом с данным генотипом (%) The number of keratoconic patients with the genotype (%)	Число участников контрольной группы с данным генотипом (%) The number of control group participants with the genotype (%)
rs1536482	A/A	16 (22,9)	7 (7,0)
	G/A	31 (44,3)	39 (39,0)
	G/G	23 (32,9)	54 (54,0)
rs7044529	T/T	2 (2,9)	3 (3,0)
	C/T	17 (24,3)	16 (16,0)
	C/C	51 (72,9)	77 (77,0)

Таблица 4

Частота маркерных аллелей rs1536482 в группе пациентов с кератоконусом и контрольной группе, ассоциация с полом и стадией

Table 4

The rs1536482 marker allele frequency in keratoconic patients and control group, association with sex and grade

Группа Group	Частота маркерной аллели («А») Marker allele frequency («A»)	Значение p p-value
Пациенты с кератоконусом Keratoconic patients (n=70)	0,450	0,0004
Контрольная группа Control group (n=100)	0,265	
Мужчины Males (n=57)	0,288	0,2585
Женщины Females (n=43)	0,161	
Стадия 1-2 по Амслеру Amsler grade 1-2 (n=17)	0,382	0,4302
Стадия 3-4 по Амслеру Amsler grade 3-4 (n=53)	0,472	

Также была рассчитана ассоциация частоты маркерной аллели rs1536482 и rs7044529 с полом и стадией по Амслеру-Крумейху. Значимых ассоциаций выявлено не было (табл. 4 и 5).

Далее был проведен расчет диагностических показателей rs1536482 для того, чтобы оценить возможность использования данно-

го маркера в качестве классификатора кератоконуса. Хотя бы одна маркерная аллель rs1536482 была обнаружена у 67,1% пациентов (чувствительность маркера) с кератоконусом и 46% участников контрольной группы ($p=0,0078$), отношение шансов (Odds Ratio) составило 2,4, а отношение рисков (Risk Ratio) – 1,69. Таким образом, несмотря на доста-

точно высокую чувствительность, специфичность маркера является низкой ($1-0,46=0,54$).

Исследование зависимости экспрессии гена COL5A1 от генотипа rs1536482

Девяти пациентам, включенным в исследование, была проведена операция кератопластики, в ходе которой был сохранен образец рогови-

Таблица 5

Частота маркерных аллелей rs7044529 в группе пациентов с кератоконусом и контрольной группе, ассоциация с полом и стадией

Table 5

rs7044529 marker allele frequency in keratoconic patients and control group, association with sex and grade

Группа Group	Частота маркерной аллели («Т») Marker allele frequency («Т»)	Значение р p-value
Пациенты с кератоконусом Keratoconic patients (n=70)	0,150	0,2765
Контрольная группа Control group (n=100)	0,110	
Мужчины Males (n=57)	0,114	1,000
Женщины Females (n=43)	0,105	
Стадия 1–2 по Амслеру Amsler grade 1–2 (n=17)	0,118	0,7829

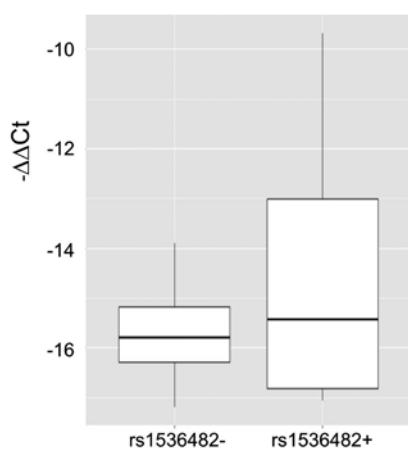


Рис. График типа «ящик с усами» для значений ΔC_t , полученных при анализе уровня экспрессии гена *COL5A1* в образцах роговицы пациентов с кератоконусом из групп «rs1536482+» и «rs1536482-». Величина ΔC_t взята со знаком минус, чтобы ось Y отражала направления увеличения экспрессии. Границы ящика определяются 75 и 25% квантилями, полоса внутри ящика – медиана значений ΔC_t в данной группе, усики – межквартильное расстояние $\times 1,5$

Fig. Box plot with whiskers for ΔC_t values of *COL5A1* gene expression level analysis in the corneal samples of keratoconus patients from the «rs1536482+» and «rs1536482-» groups. The ΔC_t value is taken with a minus sign, so that the Y axis reflects the directions of increase in expression. The borders of the box are determined by 75% and 25% quartiles, the line inside the box – median ΔC_t values in this group, the whiskers – interquartile distance $\times 1,5$

цы. Из них пять образцов имели хотя бы одну маркерную аллель («А/А» или «G/A») и были обозначены как группа «rs1536482+». Четыре пациента имели генотип «G/G» и были объединены в группу «rs1536482-». Была исследована ассоциация уровня экспрессии гена *COL5A1* от генотипа rs1536482. В каждой группе сравнения было по 4 образца. Значения ΔC_t в группах образцов пациентов с кератоконусом «rs1536482+» и «rs1536482-» представлены на графиках на рис. По результатам анализа, с помощью непараметрического теста U-критерий Манна-Уитни, нулевая гипотеза не была отвергнута ($-\Delta C_t=1,3$; $2^{-\Delta C_t}=0,4$, $p=0,9$), т.е.

ассоциация уровня экспрессии гена *COL5A1* с генотипом отсутствует.

ОБСУЖДЕНИЕ

Определение новых кандидатных генетических маркеров кератоконуса может в дальнейшем стать ключевым звеном, как в диагностике кератоконуса, так и при планировании различных подходов к его лечению. Одними из кандидатных генетических маркеров кератоконуса являются варианты, расположенные вблизи и в интроне гена *COL5A1*: rs1536482 и rs7044529. Их ассоциация с центральной толщиной ро-

говицы была многократно подтверждена [15–18]. Маркерные аллели данных вариантов значимо чаще встречались в группах пациентов с кератоконусом по сравнению с контрольными группами [17, 19]. Однако, поскольку частота встречаемости rs1536482 и rs7044529 в российской выборке пациентов с кератоконусом ранее не изучалась, исследование данных вариантов в российской выборке представилось весьма актуальным.

В результате генотипирования российской выборки была выявлена значимая ассоциация rs1536482 с кератоконусом. Для оценки возможности его применения в каче-

стве классификатора был проведен расчет диагностических показателей. В расчетах использовалась доминантная модель наследования кератоконуса, при которой достаточно наличия хотя бы одной маркерной аллели «А» для проявления заболевания в фенотипе. При данных условиях показатель чувствительности rs1536482 составил 0,67, а специфичность маркера – 0,54. Это означает, что у здорового человека с наличием хотя бы одной маркерной аллели («А/А» или «G/A») вероятность возникновения кератоконуса составляет 54%. Маркер с таким показателем специфичности не может быть применен в клинической практике.

Патогенез кератоконуса сопровождается истончением стромы роговицы и ослаблением ее биомеханических свойств [29]. При кератоконусе наблюдается снижение числа коллагеновых пластинок, снижение плотности кератиноцитов [26–28]. Кроме того, изменяется состав коллагеновых фибрилл: уменьшается содержание коллагенов типов I, III, V и XII [30]. В то же время известно об ассоциации SNV вблизи и в интроне гена *COL5A1* с кератоконусом. В связи с этим была проверена гипотеза о возможном влиянии каузальных вариантов, которые потенциально располагаются в районе промотора гена *COL5A1* и неравновесно сцеплены с rs1536482, на экспрессию гена *COL5A1*. Для этого были сформированы группы пациентов, имеющих хотя бы одну маркерную аллель (rs1536482+) и имеющие только референсную аллель (rs1536482-), и у которых в ходе операции кератопластики были собраны образцы роговицы для выделения РНК. Ранее сообщалось о наличии разницы в уровне экспрессии *COL5A1* в сходных группах сравнения, но она не достигла заданного уровня значимости [31]. В результате нашего анализа не было обнаружено значимой разницы в уровне экспрессии между образцами пациентов, которые имели или не имели маркерные аллели в rs1536482.

ВЫВОДЫ

В данном исследовании была впервые выявлена ассоциация rs1536482 с кератоконусом в выборке пациентов из России. Наличие маркерной аллели не ассоциировалось с уровнем экспрессии гена *COL5A1*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-06077.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol*. 1998;42(4): 297–319. doi:10.1016/s0039-6257(97)00119-7.
2. Tanabe U, Fujiki K, Ogawa A, Ueda S, Kanai A. [Prevalence of keratoconus patients in Japan]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1985;89(3): 407–11.
3. Waked N, Fayad AM, Fadlallah A, El Rami H. Keratoconus screening in a Lebanese students' population. *J Fr Ophthalmol*. 2012;35(1): 23–9. doi:10.1016/j.jfo.2011.03.016.
4. Said A, Hamade IH, Tabbara KF. Late onset corneal ectasia after LASIK surgery. *Saudi J Ophthalmol*. 2011;25(3): 225–30. doi:10.1016/j.sjopt.2011.05.003.
5. Randleman JB, Woodward M, Lynn MJ, Stulting RD. Risk assessment for ectasia after corneal refractive surgery. *Ophthalmology*. 2008;115(1): 37–50. doi:10.1016/j.jophtha.2007.03.073.
6. Giri P, Azar DT. Risk profiles of ectasia after keratorefractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017;28(4): 337–42. doi:10.1097/ICU.0000000000000383.
7. Owens H, Walters GA. Keratoconus in monozygotic twins in New Zealand. 1995; *Clin Exper Optometry*. 78(4): 125–9. doi:10.1111/j.1444-0938.1995.tb00805.x.
8. Bechara SJ, Insler MS. Keratoconus in two pairs of identical twins. *Cornea*. 1996 Jan;15(1): 90–3.
9. Tuft SJ, Hassan H, George S, Frazer DG, Willoughby CE, Liskova P. Keratoconus in 18 pairs of twins. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(6): e482-6. doi:10.1111/j.1755-3768.2012.02448.x.
10. Bykhovskaya Y, Margines B, Rabinowitz YS. Genetics in Keratoconus: where are we? *Eye Vis (Lond)*. 2016;3(1): 16. doi:10.1186/s40662-016-0047-5.
11. Burdon KP, Vincent AL. Insights into keratoconus from a genetic perspective. *Clin Exp Optom*. 2013;96(2): 146–54.
12. Nowak DM, Gajacka M. Nonrandom distribution of miRNAs genes and single nucleotide variants in keratoconus loci. *PLoS one*. 2015;10(7): e0132143. doi:10.1371/journal.pone.0132143.
13. Титов К.Х., Хасанова Р.Р., Лобов С.Л., Джемилева Л.У., Усубов Э.Л., Бикбов М.М., Хуснутдинова Э.К. Анализ мутаций в гене SOD1 у пациентов с кератоконусом. Молекулярная диагностика 2017. Сборник Трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. М.; 2017: 435–6. [Titojan KH, Hasanova RR, Lobov SL, Dzhemileva LU, Usupov EL, Bikbov MM, Khushnutdinova EK. Analiz mutacij v gene SOD1 u pacientov s keratokonusom. Molekuljarnaja Diagnostika 2017. Sbornik Trudov IX Vserossijskoj Nauchno-Prakticheskoj Konferencii S Mezhdunarodnym Uchastiem. M.; 2017: 435–6 (In Russ.).]
14. Скородумова Л.О., Белодедова А.В., Шарова Е.И., Малигин Б.Э. Поиск генетических маркеров для уточняющей диагностики кератоконуса. Биомедицинская химия. 2019;65(1): 9–20. [Skorodumova LO, Belodedova AV, Sharova EI, Malugin BE. Search for genetic markers for precise diagnostics of keratoconus. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement

Series B: Biomedical Chemistry. 2019; 65(1): 9–20 (In Russ.).] doi:10.1134/S1990750819030090.

15. Vitart V, Benčić G, Hayward C, Skunca Herman J, Huffman J, Campbell S, Bućan K, Navarro P, Gunjaca G, Marin J, Zgaga L. New loci associated with central cornea thickness include *COL5A1*, *AKAP13* and *AVGR8*. *Hum Mol Genet*. 2010;19(21): 4304–11. doi:10.1093/hmg/ddq349.
16. Vithana EN, Aung T, Khor CC, Cornes BK, Tay WT, Sim X, Lavanya R, Wu R, Zheng Y, Hibberd ML, Chia KS. Collagen-related genes influence the glaucoma risk factor, central corneal thickness. *Hum Mol Genet*. 2011; 15;20(4): 649–58. doi:10.1093/hmg/ddq511.
17. Lu Y, Vitart V, Burdon KP, Khor CC, Bykhovskaya Y, Mirshahi A, Hewitt AW, Koehn D, Hysi PG, Ramdas WD, Zeller T. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. *Nat Genet*. 2013;45(2): 155–63. doi:10.1038/ng.2506.
18. Iglesias AI, Mishra A, Vitart V, Bykhovskaya Y, Höhn R, Springelkamp H, Cuellar-Partida G, Gharahkhani P, Bailey JN, Willoughby CE, Li X. Cross-ancestry genome-wide association analysis of corneal thickness strengthens link between complex and Mendelian eye diseases. *Nature communications*. 2018;14;9(1): 1864. doi:10.1038/s41467-018-03646-6.
19. Li X, Bykhovskaya Y, Canedo ALC, et al. Genetic Association of *COL5A1* Variants in Keratoconus Patients Suggests a Complex Connection between Corneal Thinning and Keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(4): 2696. doi:10.1167/iov.13-11601.
20. Sahebajada S, Sahebajada S, Schache M, Richardson AJ, Snibson G, MacGregor S, Daniell M, Baird PN. Evaluating the Association between Keratoconus and the Corneal Thickness Genes in an Independent Australian Population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(13): 8224. doi:10.1167/iov.13-12982.
21. Liskova P, Dudakova L, Kreplova A, Klema J, Hysi PG. Replication of SNP associations with keratoconus in a Czech cohort. *PLoS One*. 2017;12(2): e0172365. doi:10.1371/journal.pone.0172365.
22. Segev F, Héon E, Cole WG, Wenstrup RJ, Young F, Slomovic AR, Rootman DS, Whitaker-Menezes D, Chervoneva I, Birk DE. Structural abnormalities of the cornea and lid resulting from collagen V mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(2): 565–73.
23. Smith SM, Birk DE. Focus on molecules: collagens V and XI. *Exp Eye Res*. 2012;98: 105–6. doi:10.1016/j.exer.2010.08.003.
24. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH. Null alleles of the *COL5A1* gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *Am J Hum Genet*. 2000;66(6): 1757–65. doi:10.1086/302933.
25. De Paeppe A, Nuytincck L, Hauser I, Anton-Lamprecht I, Naejaert JM. Mutations in the *COL5A1* gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *Am J Hum Genet*. 1997;60(3): 547–54.
26. Alkanaani A, Barsotti R, Kirat O, Khan A, Almubrad T, Akhtar S. Collagen fibrils and proteoglycans of peripheral and central stroma of the keratoconus cornea-Ultrastructure and 3D transmission electron tomography. *Scientific Reports*. 2019;9(1): 19963. doi:10.1038/s41598-019-56529-1.
27. Mathew JH, Goosey JD, Bergmanson JP. Quantified histopathology of the keratoconic cornea. *Optom Vis Sci*. 2011;88(8): 988–97. doi:10.1097/OPX.0b013e31821fbbd4.
28. Takahashi A, Nakayasu K, Okisaka S, et al. Quantitative analysis of collagen fiber in keratoconus. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 1990;94: 1068–73.
29. Khaled ML, Helwa I, Drewry M, Seremwe M, Estes A, Liu Y. Molecular and histopathological changes associated with keratoconus. *BioMed research international*. 2017;7803029. doi:10.1155/2017/7803029.
30. Chaerkady R, Shao R, Scott SG, Pandey A, Jun AS, Chakravarti S. The keratoconus corneal proteome: loss of epithelial integrity and stromal degeneration. *J Proteomics*. 2013;87: 122–31. doi:10.1016/j.jprot.2013.05.023.
31. Bykhovskaya Y, Gromova A, Makarenkova HP, Rabinowitz YS. Abnormal regulation of extracellular matrix and adhesion molecules in corneas of patients with keratoconus. *Int J Keratoconus Ectatic Corneal Dis*. 2016;5(2): 63–70. doi:10.5005/ijp-journals-10025-1123.

Поступила 10.01.2020