doi: 10.17116/oftalma2016132110-14

Оценка полиморфизма гена *CFH* у больных с первичной открытоугольной глаукомой

О.Н. ЛЕВАНОВА, В.А. СОКОЛОВ, Н.А. НИКИФОРОВ

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Высоковольтная, 9, Рязань, Российская Федерация, 390026

Цель — изучить полиморфизм гена *CFH* (T402H) у больных с глаукомой и пациентов группы контроля. **Материал и методы.** Генетический анализ проводили у 68 пациентов с разными стадиями первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). Контрольную группу составили 30 человек. Материалом исследования служила венозная кровь. Анализу подвергали геномную ДНК человека, выделенную из лейкоцитов цельной крови. Далее с образцами выделенной ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР). **Результаты.** Среди обследованных (как в группе больных с ПОУГ, так и в группе контроля) не было обнаружено пациентов с гомозиготным полиморфизмом по аллелю 402H. При прогрессировании патологического процесса (гибели ганглионарных клеток) количество гомозигот с отсутствием полиморфизма гена *CFH* увеличивается до 65%, а количество гетерозигот уменьшается до 35%. **Выводы.** Наши генетические исследования показали, что при начальной и развитой стадии ПОУГ превалируют гетерозиготы. На этих стадиях патологического процесса большая вероятность повреждения собственных ганглионарных клеток. С прогрессированием заболевания количество гетерозигот постепенно уменьшается до 35%, что связано со значительной гибелью клеток нейроэпителия и как следствие — снижением интенсивности аутоиммунной реакции из-за уменьшения числа клеток-мишеней.

Ключевые слова: *первичная открытоугольная глаукома, фактор комплемента H, полиморфизм гена CFH.*

CFH gene polymorphism in primary open-angle glaucoma patients

O.N. LEVANOVA, V.A. SOKOLOV, N.A. NIKIFOROV

Ryazan State Medical University named after acad. I.P. Pavlov, Ministry of Health of Russia, 9 Vysokovol'tnaya St., Ryazan, Russian Federation, 390026

Aim — to study the *CFH* T402H polymorphism in glaucoma patients and controls. **Material and methods.** Genetic analysis was performed in 68 patients with primary open-angle glaucoma (POAG) of various severity. The control group consisted of 30 participants. Venous whole blood samples were obtained. From them, leukocytes were isolated and human genomic DNA extracted for further PCR. **Results.** None of the patients from either group was homozygous for the 402H allele. With ganglion cells death (i.e. at later stages of the disease), the percentage of homozygotes that carry no *CFH* polymorphism increases up to 65%, while that of heterozygotes decreases down to 35%. **Conclusion.** As shown, most of early and advanced POAG patients are heterozygotes. At these stages of the disease own ganglion cells are very likely to be damaged. Further progression, however, is associated with a gradual decrease in heterozygotes (down to 35%) due to a substantial loss of neuroepithelial cells and suppression of the autoimmune response which has lost its target.

Keywords: *primary open-angle glaucoma, complement factor H, CFH gene polymorphisms.*

В настоящее время глаукому рассматривают как нейродегенеративное заболевание, характеризующееся изменениями не только сетчатки и зрительного нерва, но и более высоких отделов зрительного пути. Причинами этого могут быть неизученные на сегодняшний день механизмы патогенеза и факторы прогрессирования глаукомы [1—3].

Анализ многочисленных литературных данных, посвященных глаукоме, свидетельствует о системном поражении соединительно-тканных структур глаза, эндотелия микроциркуляторного русла и нейротрофических нарушениях зрительного нерва и его окружения. Такая системность нарушений функционирования нервной, сосудистой, соединительной ткани одного органа может быть связана с дисфункцией иммунной системы и развитием хронического иммунного воспаления.

Работа иммунной системы является необходимой внутренней реакцией, но если происходит сбой в ее регуляции, иммунная активность может превратиться в аутоиммунный процесс травмы. В дополнение к данным о потенциальной цитотоксичности аутореактивных Т-клеток и аутоантител [4] имеются сведения, что неконтролируемая активация также может способствовать прогрессированию дегенеративной травмы ганглионарных клеток сетчатки, их синапсов и аксонов при глаукоме. Последние гистопатологические исследования тканей человека по-

© Коллектив авторов, 2016

Для корреспонденции:
Леванова Ольга Николаевна — очный аспирант каф. глазных и ЛОР-болезней
e-mail: Levanova.olga2013@yandex.ru

казали формирование компонентов комплемента в сетчатке при глаукоме [5, 6].

Комплемент (система комплемента) (от лат. *complementum* — дополнение) — группа глобулярных белков сыворотки крови животных и человека, представляющих собой часть иммунной системы организма. При попадании в организм инфицирующих его бактерий или вирусов, некоторых токсинов или возникновении собственных трансформированных клеток происходит активация комплемента, в результате чего клетки-мишени лизируются (разрушаются), а токсины и вирусы нейтрализуются. Поэтому систему комплемента рассматривают наряду с макрофагами как передовой рубеж иммунной защиты организма [7].

Каскад комплемента активируется как часть врожденной иммунной реакции против патогенов, а также служит для очистки от нежелательных клеток и продуктов клеточного распада [7].

Недавние исследования L. Ren [8] выявили, что комплемент принимает участие в уничтожении синапсов в центральной нервной системе (ЦНС) [9], это делает его причастным к развитию нейродегенеративных заболеваний, в том числе глаукомы.

Нарушение регуляции и активации белков комплемента является последовательными особенностями при глаукоме у человека и животных [8, 10—12].

Известно, что система комплемента регулируется несколькими белками. Одним из самых важных является плазменный белок — фактор комплемента H (CFH). Определенные мутации нарушают способность изучаемого гена адекватно контролировать функционирование системы комплемента, которая начинает атаковать собственные клетки организма [13].

Участок ДНК в кодирующей области гена *CFH*, в котором азотистое основание тимин (T) заменяется на цитозин (C), называется генетическим маркером T1204C. В результате аминокислота тирозин заменяется на гистидин в позиции 402 аминокислотной последовательности белка CFH (Tyr402His). Такие «однобуквенные» погрешности в записи генов называют единичными нуклеотидными полиморфизмами [14—19].

Местный синтез компонентов комплемента в ЦНС может иметь и другие функции помимо своих прямых иммунологических. Недавние исследования показали, что комплемент принимает участие в уничтожении синапсов в ЦНС [9] и других дегенеративных процессах [20], что делает его причастным к таким заболеваниям, как шизофрения [21], болезнь Альцгеймера [22], болезнь Паркинсона [23], глаукома [8].

Было высказано предположение, что каскад комплемента может играть разные роли в патогенезе глаукомы в зависимости от стадии [8].

Учитывая аутоиммунные звенья патогенеза первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ), представляет интерес исследование фактора H системы комплемента у больных с данной патологией.

На основании вышеизложенного мы поставили цель изучить полиморфизм гена *CFH* у больных с глаукомой и пациентов группы контроля.

Материал и методы

Генетический анализ проводили у 68 пациентов (основная группа) с разными стадиями ПОУГ. Возраст обследуемых (из них 28 женщин и 40 мужчин) колебался от 32 до 79 лет и в среднем составил 66,7 года.

В контрольную группу вошли 30 человек (17 мужчин и 13 женщин), не страдающих ПОУГ, с различной соматической возрастной патологией, сопоставимой с таковой в основной группе. Средний возраст пациентов составил 72,2 года (от 27 до 75 лет).

Материалом исследования служила венозная кровь.

Анализу подвергали геномную ДНК человека, выделенную из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента ДНК-экспресс-кровь и системы SNP-экспресс-РВ ООО НТП «Литех» (Москва).

Исследование выполняли на базе центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Выделение ДНК производили из 5 мл венозной крови. Далее с образцами выделенной ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием комплекта реагентов SNP-экспресс-РВ на амплификаторе iCycler iQ5 (Riorad).

Все исследования проводили с соблюдением принципов GCP и Хельсинской декларации с разрешения локального этического комитета.

Результаты и обсуждение

Среди обследованных (как в группе больных с ПОУГ, так и в группе контроля) не было обнаружено пациентов с гомозиготным полиморфизмом по аллелю 402H. Гомозиготы с отсутствием полиморфизма гена *CFH* составили 40% среди больных с глаукомой и 30% в контрольной группе. Гетерозиготы составили 60% в основной группе и 40% — в контрольной. Таким образом, гетерозиготы превалировали как среди больных с глаукомой, так и среди пациентов контрольной группы.

Анализ полученных результатов (60% больных с глаукомой являются носителями мутации гена) позволяет предположить аутоиммунную природу патогенеза ПОУГ и возможное участие системы комплемента в патологическом процессе. Однако похожие результаты исследования мы наблюдаем и в группе контроля (30% нормозигот и 70% гетерозигот).

Следующим этапом исследования стало изучение полиморфизма гена *CFH* у больных с ПОУГ разных стадий патологического процесса.

В зависимости от стадии заболевания больные с ПОУГ были разделены на 3 группы: 1-ю группу составили 25 пациентов с I стадией, 2-ю — 23 пациента со II стадией, 3-ю — 20 пациентов с III—IV стадией ПОУГ.

Выявлено, что гомозигот с отсутствием полиморфизма гена *CFH* среди пациентов с I стадией ПОУГ было 25%, а гетерозигот 75% **(см. таблицу и рисунок)**. В группе больных со II стадией как гомозиготы с отсутствием полиморфизма, так и гетерозиготы составили 50% **(см. таблицу и рисунок)**.

Для сравнительного анализа выборок и выявления ассоциативных связей при оценке молекулярно-генетических данных был использован непараметрический критерий χ^2 Пирсона для несвязных выборок.

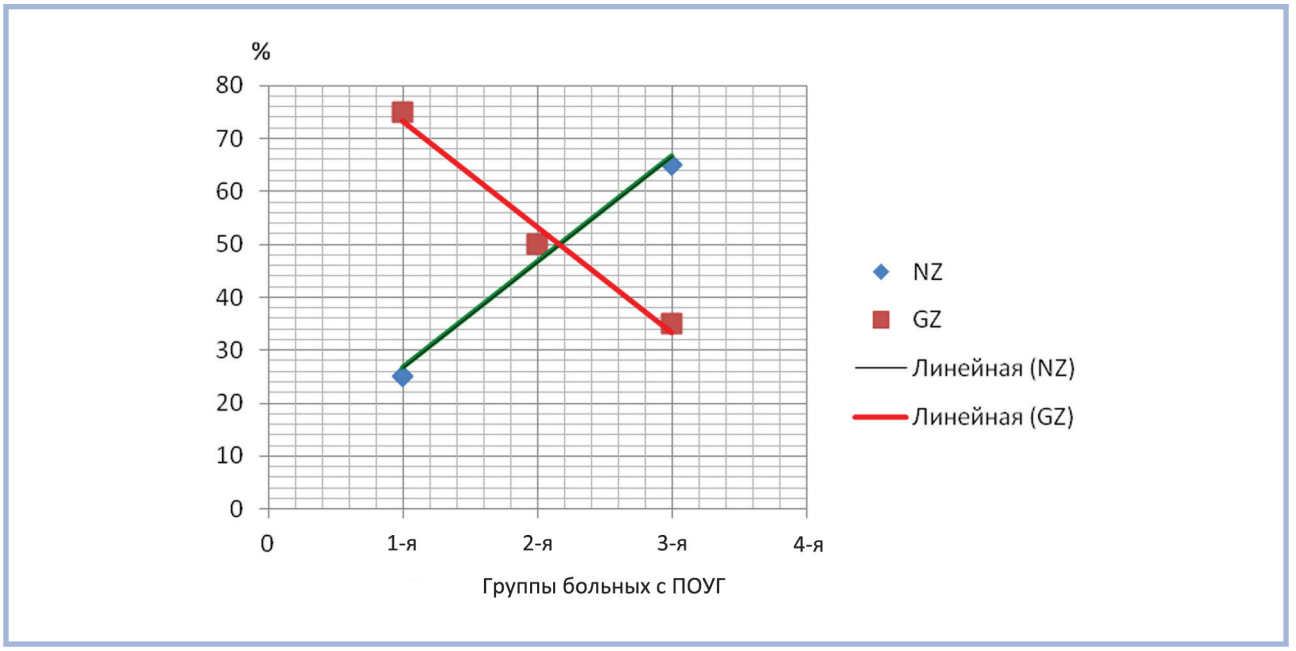
На основании результатов статистической обработки полученных данных непараметрическим методом χ^2 Пирсона установлена связь между отсутствием/наличием полиморфизма гена *CFH* и стадией прогрессирования ПОУГ (p=0,037). Кроме того, выявлен линейный тренд, указывающий на зависимость между отсутствием/наличием полиморфизма и стадией заболевания (критерий χ^2 с p=0,004) **(см. рисунок)**.

Отметим, что с прогрессированием ПОУГ увеличивается частота отсутствия полиморфизма. При приближении к финалу патологического процесса (гибели ганглионарных клеток) количество гомозигот с отсутствием полиморфизма гена *CFH* увеличивается до 65%, а количество гетерозигот уменьшается до 35% **(см. таблицу и рисунок)**.

Полиморфизм гена *CFH* у больных с ПОУГ и пациентов группы контроля

Группа	Число пациентов	Полиморфизм гена	
		гомозиготы с отсутствием полиморфизма гена *CFH*, %	гетерозиготы, %
Больные с ПОУГ:			
1-я группа (I стадия)	20	25±9,7 p_1=0,9	75±9,7 p_1=0,9
2-я группа (II стадия)	22	50±20,9 p_1=0,24 p_2=0,18	50±20,9 p_1=0,24 p_2=0,18
3-я группа (III—IV стадия)	20	65±10,7 p_1=0,031 p_2=0,026 p_3=0,5	35±10,7 p_1=0,031 p_2=0,026 p_3=0,5
Контроль	30	30	70

Примечание. Данные сравнивались с помощью построения таблиц сопряженности признаков и проверки статистической гипотезы об отсутствии различий между показателями групп по критерию χ^2 Пирсона. p — достоверность показателей групп пациентов: p_1 — по сравнению с показателями контроля, p_2 — по сравнению с показателями 1-й группы, p_3 — по сравнению с показателями 2-й группы. При p<0,05 различие между показателями групп существенно, при p>0,05 — несущественно.



Линейная зависимость между стадией ПОУГ и отсутствием/наличием полиморфизма.

Экспериментальные исследования зарубежных ученых показали, что в начале развития глаукомы имеет место активация воспалительных процессов. В частности, каскад комплемента активируется очень рано у DBA/2J-мышей, широко используемых в качестве модели для экспериментальной глаукомы. У DBA/2J-мышей развиваются признаки человеческой глаукомы, включая повышение внутриглазного давления (ВГД) и раннее повреждение аксонов ганглионарных клеток в головке зрительного нерва [11, 24, 25].

Мутации фактора Н у больных с ПОУГ нарушают способность гена *CFH* адекватно контролировать функционирование системы комплемента. Нарушение работы этой системы способствует чрезмерному увеличению экспрессии ряда компонентов каскада комплемента, в частности C5, C3, C1q. Из данных литературы известно, что избыточное количество компонентов комплемента усугубляет течение ПОУГ.

M. Kuehn и соавт. [5] в своем иммуногистохимическом исследовании, наблюдая повышенную экспрессию C1q и C3 в ганглионарном слое сетчатки и в слое нервных волокон больных с ПОУГ и крыс с экспериментально повышенным ВГД, пришли к выводу, что чрезмерная активация комплемента, в частности формирование мембрано-атакующего комплекса, способна привести к лизису ганглионарных клеток.

Наши генетические исследования показали, что при начальной стадии ПОУГ превалируют пациенты, являющиеся носителями мутации фактора Н (т.е. гетерозиготы). На этих стадиях патологического процесса велика большая вероятность повреждения собственных клеток нейроэпителия, т.е. ганглионарных клеток. С прогрессированием заболевания количество гетерозигот постепенно снижается с 75 до 35%. Превалирование локальных мутаций полиморфизма гена *CFH* (по аллелю 402H в гене фактора комплемента Н) в начальных стадиях развития ПОУГ свидетельствует о том, что нарушение регуляции в системе комплемента является пусковым (триггерным) механизмом при данном заболевании и происходящие процессы носят аутоиммунный характер. Это подтверждает высказанные в литературе предположения о роли системы комплемента в патогенезе глаукомы [8].

В начале заболевания система комплемента играет роль посредника в удалении дендритных синапсов ганглионарных клеток [9], тем самым снижая их выживаемость. Как только клеточная смерть становится неизбежной и ганглиоциты начинают подвергаться апоптозу, система комплемента способствует удалению клеточного «мусора» и уменьшению воспалительной реакции [8]. С другой стороны, комплемент может подвергать лизису и здоровые клетки, усугубляя патологический процесс [5]. Кроме того, система комплемента может активировать соседние глиальные клетки и заставить их синтезировать различные медиаторы воспаления, в том числе цитокины и супероксидные радикалы, что приводит к еще большей гибели ганглиоцитов. Активация ганглионарных клеток как один из механизмов развития патологического процесса при глаукоме продемонстрирована в работах A. Bosco [26] и A. Ebneter [27].

Снижение количества пациентов (с 75 до 35%) с гетерозиготным полиморфизмом по аллелю 402H в гене фактора комплемента Н по мере прогрессирования глаукомного процесса в нашем исследовании, возможно, связано со спадом интенсивности аутоиммунной реакции при переходе от одной стадии ПОУГ к другой из-за гибели ганглионарных клеток, т.е. уменьшения количества клеток-мишеней.

Выводы

1. Среди обследованных (как в группе больных с ПОУГ, так и в группе контроля) не было обнаружено пациентов с гомозиготным полиморфизмом по аллелю 402H. Гомозиготы с отсутствием полиморфизма гена *CFH* составили 40% среди больных с глаукомой и 30% в контрольной группе, гетерозиготы составили соответственно 60 и 40%.

2. Установлена связь между отсутствием/наличием полиморфизма гена *CFH* и стадией прогрессирования ПОУГ (p=0,037). Кроме того выявлена линейная зависимость между отсутствием/наличием полиморфизма и стадией заболевания (критерий χ^2 с p=0,004).

Превалирование локальных мутаций полиморфизма гена *CFH* (по аллелю 402H в гене фактора комплемента Н) в начальных стадиях развития ПОУГ свидетельствует о том, что нарушение регуляции в системе комплемента является пусковым (триггерным) механизмом при данном заболевании, и происходящие процессы носят аутоиммунный характер. Возможно, это связано со спадом интенсивности аутоиммунной реакции при переходе от одной стадии ПОУГ к другой из-за гибели ганглионарных клеток, т.е. уменьшения количества клеток-мишеней.

Участие авторов:
Концепция и дизайн исследования: Н.Н., О.Л.
Сбор и обработка материала: О.Л.
Статистическая обработка: О.Л.
Написание текста: О.Л.
Редактирование: В.С.

Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abu-Amero K, Morales J, Bosley T. Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(6):2533-2541.
   doi:10.1167/iovs.05-1639.
2. Izzotti A. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. *Arch Opthalmol*. 2010;128(6):724-730.
   doi: 10.1001/archophthalmol.2010.87.
3. Tatton W. Maintaining mitochondrial membrane impermeability: an opportunity for new therapy in glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2001;45:277-283.
   doi:10.1016/s0039-6257(01)00207-7.
4. Tezel G, Wax M. The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J Neurosci*. 2000;20:3552-3562.
5. Kuehn M. Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension. *Exp Eye Res*. 2006;83:620-628.
   doi:10.1016/j.exer.2006.03.002.
6. Stasi K. Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:1024-1029.
   doi:10.1167/iovs.05-0830.
7. Zipfel P. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol Lett*. 2009;126(1-2):1-7.
   doi:10.1016/j.imlet.2009.07.005.
8. Ren L, Danias J. A role for complement in glaucoma. *Adv Exp Med Biol*. 2010;703:95-104.
   doi:10.1007/978-1-4419-5635-4_7.
9. Stevens B. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131:1164-1178.
   doi:10.1016/j.cell.2007.10.036.
10. Jha P. Complement mediated apoptosis leads to the loss of retinal ganglion cells in animal model of glaucoma. *Mol Immunol*. 2011;48(15-16):2151-2158.
    doi:10.1016/j.molimm.2011.07.012.
11. Howell G. Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1429-1444.
    doi:10.1172/jci44646.
12. Rosen A, Stevens B. The role of the classical complement cascade in synapse loss during development and glaucoma. *Adv Exp Med Biol*. 2010;703:75-93.
    doi:10.1007/978-1-4419-5635-4_6.
13. Jozsi M, Zipfel P. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol*. 2008;29(8):380-387.
    doi:10.1016/j.it.2008.04.008.
14. Conley Y. Candidate gene analysis suggests a role for fatty acid biosynthesis and regulation of the complement system in the etiology of age-related maculopathy. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1991-2002.
    doi:10.1093/hmg/ddi204.
15. Edwards A. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):421-424.
    doi:10.1126/science.1110189.
16. Hageman G. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:7227-7232.
    doi:10.1073/pnas.0501536102.
17. Haines J. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308:419-421.
    doi:10.1126/science.1110359.
18. Klein R. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308:385-389.
    doi:10.1126/science.1109557.
19. Zareparsi S. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*. 2005;77:5-13.
    doi:10.1086/431426.
20. Ricklin D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunol*. 2010;11(9):785-797.
    doi:10.1038/ni.1923.
21. Hakobyan S, Boyajyan A, Sim R. Classical pathway complement activity in schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2005;1:35-37.
    doi:10.1016/j.neulet.2004.10.024.
22. Fonseca M. Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *J Immunol*. 2009;183(2):1375-1383.
    doi:10.4049/jimmunol.0901005.
23. Loeffler D, Camp D, Conant S. Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study. *Journal of Neuroinflammation*. 2006;3:1-8.
    doi:10.1186/1742-2094-3-29.
24. Schlamp C. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci*. 2006;7:66.
    doi:10.1083/jcb.200706181.
25. Soto I. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci*. 2008;28(2):548-561.
    doi:10.1523/jneurosci.3714-07.2008.
26. Bosco A, Steele M, Vetter M. Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol*. 2011;519:599-620.
    doi:10.1002/cne.22516.
27. Ebneter A. Microglial activation in the visual pathway in experimental glaucoma: spatiotemporal characterization and correlation with axonal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:6448-6460.
    doi:10.1167/iovs.10-5284.

Поступила 02.02.2015