

УДК 617.753.2:616-053.2-07.576

Поліморфізм rs1800469 гена TGF- β 1 у дітей різним ступенем міопії**Н. В. Малачкова**, канд. мед. наук; **Д. А. Яценко**, аспірант; **Г. П. Людкевич**,
В. М. Шкарупа, канд. біол. наукВінницький національний медичний
університет ім. М.І. Пирогова;
Вінниця (Україна)E-mail: malachkovnatalia@gmail.com
dr.yatsengo@gmail.com**Ключові слова:**міопія, склера, TGF- β 1, поліморфізм*TGF- β є одним із важливих медіаторів регуляції змін структури позаклітинного матриксу склери. Проведено дослідження особливостей розподілу поліморфних варіантів rs1800469 гена TGF- β 1 у дітей Подільського регіону України з міопією різного ступеня. Вперше показано, що у європейській популяції генотип CC (rs1800469) асоціюється з підвищеним ризиком розвитку міопії високого ступеня (ВШ = 2.47, 95% ДІ%: 0,97 – 6.27, p = 0,02). Достовірних відмінностей в частотах алелей та розподілі генотипів за дослідженим поліморфним маркером між дітьми-еметропами та дітьми з міопією слабкого і середнього ступеня не виявлено.*

Актуальність. Міопія – поширене мультифакторіальне захворювання зі спадковою схильністю. За прогнозами ВООЗ, кількість хворих на міопію у 2050 році може сягати до 49,8%, причому кількість хворих з високим ступенем міопії збільшиться з 2,7 до 9,8% [5]. Особлива увага приділяється прогресуючій формі короткозорості, яка призводить до розвитку ускладнень з тяжким перебігом (глаукома, дегенеративні зміни та відшарування скловидного тіла та сітківки) та характеризується порушеннями функцій органа зору, що суттєво впливає на професійну і соціальну адаптацію підлітків та якість життя [4].

Найбільш вагомим чинником у розвитку короткозорості є збільшення аксіального розміру очного яблука, що може бути обумовлено генетично та прогресувати у підлітковому віці [14]. В експериментальних моделях міопії на тваринах показано, що активне ремоделювання матриксу склери відіграє вирішальну роль у видовженні передньо-заднього відрізка (ПЗВ) очного яблука [12, 19]. Трансформуючий фактор росту – бета (TGF- β) є одним з ключових медіаторів регуляції змін екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). Показано, що TGF- β 1 (одна з трьох ізоформ TGF- β) стимулює продукцію білків ЕЦМ – колагену і фібронектину, знижує рівень секреції ферментів дегградації ЕЦМ – колагенази, гепарінази та стромеліазину або стимулює продукцію білків, що пригнічують їх активність – інгібітора тканинного активатора плазміногену-1 та тканинного інгібітора металопротеїнази [7, 8, 11, 12, 19].

Виявлена асоціація ряду однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена TGF- β 1 з ризиком розвитку міопії високого ступеня [9, 10, 13, 16]. Проте існують дослідження, в яких не виявлено зв'язку ризику розвитку міопії високого ступеня з поліморфізмом гена TGF- β 1, або результати яких є суперечливими [2, 13, 16, 17]. При цьому слід зазначити, що всі існуючі на сьогодні дослідження значення поліморфізму гена TGF- β 1 в патогенезі міопії були проведені лише в різних попу-

ляціях Азії, та за одиничним виключенням [17] тільки для осіб з високою міопією. Питання аналізу асоціації поліморфізму гена TGF- β 1 з міопією різного ступеня в європейських популяціях залишається не вивченим. Розуміння механізмів, що відбуваються у склері, лежать в основі росту очей та, з іншого боку, призводять до розвитку аномалій рефракції, зокрема осьової міопії [12]. На сьогодні, серед дослідників-офтальмологів пріоритетним є завдання створення таргетного лікування короткозорості, шляхом терапевтичного впливу на мішені у корнео-склеральній оболонці.

Мета дослідження – провести дослідження особливостей розподілу частот та генотипів за поліморфізмом rs1800469 гена TGF- β 1 у дітей Подільського регіону України з різним ступенем міопії.

Матеріал і методи

Було проведено генотипування за поліморфізмом rs1800469 гена TGF- β 1 у 105 дітей-міопів (210 очей) від 4 до 18 (середній вік 11,3 \pm 3,4 років), які знаходились під спостереженням у період з 2016 по 2017 роки. Пацієнти розділені на 3 групи: з міопією слабкого ступеня (49 осіб), середнього ступеня (34 особи) і високого ступеня (22 особи). До контрольної групи зі 107 осіб (214 очей) включені діти з еметропією від 4 до 13 років (середній вік 7,7 \pm 1,3 років). Обстеження проводились на базі Вінницької обласної дитячої клінічної лікарні та офтальмологічного центру «ОПТИМАЛ» (м. Вінниця). В обстеження були включені діти, що мешкали у різних областях України (у т.ч. Вінницькій, Хмельницькій, Черкаській, Одеській, Кіровоградській та Київській), що відносяться до Подільського регіону. Письмову інформовану згоду отримано від всіх учасників дослідження згідно з положенням Гельсінкської декларації, протокол дослідження узгоджений з комісі-

сю з питань етики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Геномну ДНК екстрагували з букального епітелію з використанням набору для виділення ДНК NeoPrep DNA Magnet (Neogen, Україна) відповідно до інструкції виробника. Генотипування поліморфних варіантів TGF- β 1 -509 C>T (rs1800469) проводили методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу з використанням набору TGF- β 1-тест (ГеноТехнологія, РФ) відповідно до інструкції виробника на ампліфікаторі «iCycler IQ5» («BioRad», США). Частоти генотипів перевіряли на відповідність рівноваги Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 . Ступінь вираженості асоціації поліморфізму -509 C>T (rs1800469) з ризиком розвитку міопії визначали шляхом розрахунку коефіцієнта відношення шансів (ВШ) і його довірчого інтервалу (ДІ). Методом логістичної регресії оцінювали мультиплікативну, аддитивну, домінуючу і рецесивну моделі асоціації досліджуваного поліморфізму з ризиком розвитку міопії різного ступеня. Для порівняння частот генотипів між різними групами використовували критерій χ^2 або точний двосторонній тест Фішера (коли кількість спостережень принаймні в одному з елементів таблиці спряженості була менше п'яти).

Результати та їх обговорення

Результати генотипування представлені в таблиці 1. В усіх досліджених групах, крім дітей із середнім ступенем міопії ($\chi^2 = 6,8$, $p = 0,01$), розподіл генотипів відповідав рівновазі Харді-Вайнберга.

В групах дітей з еметропією та слабким ступенем міопії розподіл генотипів та частоти алелей був ідентичним. У міопії середнього та високого ступеня, порівняно з еметропами та міопіями слабого ступеня, спостерігається тенденція до зменшення частоти варіантного алеля Т та збільшення частоти гомозиготних носіїв алеля С (табл. 1). Проте достовірна різниця в частотах алелей та генотипів за дослідженим поліморфізмом була виявлена лише у дітей з високим ступенем міопії (табл. 2).

Частота варіантного алеля Т в цій групі дітей була в 1,8 рази достовірно меншою, ніж у дітей із слабким

ступенем міопії ($p=0,02$) та еметропів ($p=0,01$). Хоча частота алеля Т у міопії високого ступеня була в 1,6 разів меншою, ніж у дітей з середнім ступенем міопії (0,25 та 0,40 відповідно), відмінності мали недостатній рівень статистичної значущості ($p=0,11$). Наявність алеля С за поліморфізмом -509 C>T (rs1800469) гена TGF- β 1 збільшує ризик розвитку міопії високого ступеня: ВШ = 2.44 (95% ДІ: 1.17– 5.08), $p = 0,02$ (табл. 2). Вплив поліморфних варіантів rs1800469 гена TGF- β 1 на ризик розвитку міопії високого ступеня має аддитивний характер, як це видно з результату аналізу в аддитивній моделі успадкування (табл. 2). Так, гомозиготні носії СС мають підвищений ризик розвитку міопії високого ступеня: ВШ = 2.47 (95% ДІ: 0.97– 6.27), $p=0,02$. Наявність одного варіантного алеля Т у гетерозиготних носіїв зменшує ризик розвитку міопії високого ступеня: ВШ = 0.85 (95% ДІ: 0.34 – 2.16), $p=0,02$, а гомозиготне носійство варіантного алеля Т має чітко виражений протекторний ефект щодо розвитку даної патології: ВШ = 0.16 (95% ДІ: 0.02 – 1.29), $p=0,02$. Як в домінуючій, так і в рецесивній моделях (табл. 2) виявлено підвищений ризик розвитку міопії високого ступеня у носіїв алеля С та осіб з генотипом СС ($p=0,05$), що обумовлено аддитивним характером впливу алелей. В жодній з проаналізованих моделей успадкування не виявлено асоціації поліморфізму -509 C>T (rs1800469) гена TGF- β 1 з ризиком розвитку міопії слабого та середнього ступеня.

Аналізуючи отримані результати, слід розглянути функціональну значущість дослідженого поліморфізму. -509 C-T rs1800469 є одонуклеотидним поліморфізмом в промоторній ділянці гена TGF- β 1 і призводить до збільшення рівня TGF- β 1 в плазмі. Різниця в рівні TGF- β 1 обумовлена пригніченням транскрипції регуляторним фактором AP1, який зв'язується з промотором гена TGF- β 1. Комплекс AP1, що містить JunD і c-Fos, залучається до промоторної ділянки гена лише в присутності алеля С. Підвищення рівня TGF- β 1 пов'язано з алелем Т через втрату негативної регуляції AP1 [3, 6, 18]. У носіїв генотипу СС визначаються найбільш низькі рівні TGF- β 1, у гетерозигот – дещо вищий, ніж у носіїв СС генотипу. Найбільш високий

Таблиця 1. Розподіл частот алелей і генотипів rs1800469 гена TGF- β 1 та відповідність розподілу рівнянню Харді-Вайнберга у дітей Подільського регіону з міопією різного ступеня

Група дослідження	Генотип, n (%)			p (РХВ)*	Частота варіантного алеля (Т)
	СС	СТ	ТТ		
Контроль (еметропія)	35 (32,7)	48 (44,9)	24 (22,4)	0,34	0,45
Міопія слабого ступеня	16 (32,6)	22 (44,9)	11 (22,5)	0,52	0,45
Міопія середнього ступеня	16 (47,0)	9 (26,5)	9 (26,5)	0,01	0,40
Міопія високого ступеня	12 (54,6)	9 (40,9)	1 (4,5)	0,67	0,25

Примітка: * – p відповідності рівнянню Харді-Вайнберга (РХВ)

Таблиця 2. Асоціація поліморфних варіантів rs1800469 гена TGF- β 1 з розвитком міопії різного ступеня у дітей Подільського регіону

Генотипи	Групи порівняння*		Мультиплікативна модель, ВШ, 95% ДІ	Аддитивна модель, ВШ, 95% ДІ	Домінантна модель, ВШ, 95% ДІ	Рецесивна модель, ВШ, 95% ДІ
	М1	Е				
	М1	Е	С / Т	СС/ СТ/ ТТ	СС + СТ / ТТ	СС / СТ +ТТ
СС	16	35	1.00 (0.62 – 1.61) / 1.00 (0.62 – 1.62)	1.00 (0.49 – 2.05)	1.00 (0.49 – 2.05)	1.00 (0.44 – 2.25)
СТ	22	48		1.00 (0.51 – 1.98)		1.00 (0.49 – 2.06)
ТТ	11	24		1.00 (0.45 – 2.25)		
р			0.99	1.00	0.99	1.00
	М2	Е	С / Т	СС/ СТ/ ТТ	СС + СТ / ТТ	СС / СТ +ТТ
СС	16	35	1.24 (0.71 – 2.15) / 0.81 (0.46 – 1.41)	1.83 (0.83 – 4.01)	0.80 (0.33– 1.95)	1.83 (0.83 – 4.01)
СТ	9	48		0.44(0.19 – 1.04)		1.25 (0.51– 3.02)
ТТ	9	24		1.25 (0.51 – 3.02)		
р			0.46	0.49	0.63	0.13
	М3	Е	С / Т	СС/ СТ/ ТТ	СС + СТ / ТТ	СС / СТ +ТТ
СС	12	35	2.44(1.17– 5.08) / 0.41(0.20– 0.85)	2.47 (0.97 – 6.27)	6.07 (0.78– 47.50)	2.47 (0.97– 6.27)
СТ	9	48		0.85 (0.34 – 2.16)		0.16 (0.02 – 1.29)
ТТ	1	24		0.16 (0.02 – 1.29)		
р			0.01	0.02	0.05	0.05

Примітки: М1 – міопія слабого ступеня, М2 – міопія середнього ступеня, М3 – міопія високого ступеня, Е – еметропія.

рівень експресії TGF- β 1 визначається в осіб з генотипом ТТ [18].

Відомо, що при осьовій міопії спостерігається збільшення передньо-задньої осі очного яблука, що супроводжується розтягненням і витонченням склери. Однак, якщо при міопії слабого ступеня товщина склери істотно не відрізняється від товщини склери у еметропів, то при міопії високого ступеня відбувається її виражене потоншення [1]. Зазначені процеси обумовлені біохімічними змінами, які знаходяться під контролем TGF- β 1 сигнальних шляхів. Показано, що TGF- β 1 експресується в склері та може збільшувати синтез колагену в фібробластах склери дозозалежним шляхом [11]. Зниження рівня експресії TGF β 1 спостерігали при розвитку експериментальної міопії у тварин. При цьому 30% зниження рівня TGF- β 1 супроводжувалося приблизно 15% зниженням синтезу колагену [8]. Рівні експресії мРНК TGF- β у цій роботі були диференційно знижені в залежності від часу, що на думку авторів, можливо, відображає специфічну роль TGF- β у ремоделюванні ЕЦМ склери на різних стадіях міопії [8]. Окрім цього, TGF- β 1, як зазначали вище, знижує рівень секреції ферментів деградації ЕЦМ та стимулює продукцію білків, що пригнічують їх активність [7, 8, 11, 12, 19]. Виходячи з цього, можна припустити, що у осіб з генетично обумовленим більш

низьким рівнем TGF- β 1 існує схильність до розвитку міопії високого ступеня. При міопії слабого ступеня, коли зміни товщини склери (обумовлені процесами зниженого синтезу колагену, дією ферментів деградації позаклітинного матриксу, які знаходяться під контролем TGF- β 1-сигнальних шляхів), не виражені, визначальну роль в патогенезі може грати не рівень TGF- β 1, а інші етіологічні фактори.

Очікується, що регенерація тканини склери є перспективним напрямком терапії офтальмологічної патології в найближчому майбутньому. На сучасному етапі проведено лише декілька досліджень в цьому напрямку [8, 9, 11]. Проте, цільова доставка TGF- β 1 в склеру може розглядатися як один з варіантів профілактики прогресуючої міопії. Разом з тим вказується на необхідність подальших досліджень для з'ясування як можливих побічних наслідків, так і розробки механізмів подібної терапії [15]. Отримані результати свідчать про доцільність генотипування за поліморфізмом rs1800469 гена TGF- β 1 з метою ранньої діагностики ризику розвитку міопії високого ступеня та про актуальність подальших досліджень щодо можливості використання регуляції TGF- β 1 сигнальних шляхів для розробки перспективних методів профілактики та лікування ускладнень міопії.

Висновки

Вперше показано, що в європейській популяції генотип CC (rs1800469) асоціюється з підвищеним ризиком розвитку міопії високого ступеня (ВШ = 2.47, 95% ДІ%: 0,97– 6.27, $p = 0,02$). Достовірних відмінностей в частотах алелей та розподілі генотипів за дослідженим поліморфним маркером між еметропами та дітьми з міопією слабкого і середнього ступеня не виявлено.

Литература

1. Avetisov Je. S. Blizorukost / Je. S. Avetisov. – М.: Medicina, 2002. – 288 с.
2. Biler E. D. et al. TGFB1 and LAMA1 gene polymorphisms in children with high myopia //Pakistan journal of medical sciences. – 2018. – Т. 34. – №. 2. – С. 463.
3. Cebinelli, Martellosi G. C., et al. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review//European cytokine network. – 2016. – Т. 27. №. 4. – С. 81-89.
4. Chiang P. P. C. et al. Public health impact of pathologic myopia //Pathologic Myopia. – Springer, New York, NY, 2014. – С. 75-81.
5. Holden B. A. et al. Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050 //Ophthalmology. – 2016. – Т. 123. – №. 5. – С. 1036-1042.
6. Jiang B. et al. Expression and role of specificity protein 1 in the sclera remodeling of experimental myopia in guinea pigs //International journal of ophthalmology. – 2017. – Т. 10. – №. 4. – С. 550.
7. Jobling A. I. et al. TGF-Beta as an Intrasceral Mediator of Remodeling During Myopia Development: Regulation of Scleral Proteoglycans //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2008. – Т. 49. – №. 13. – С. 1735-1735.
8. Jobling A. I. et al. Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor- β expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression //Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Т. 279. – №. 18. – С. 18121-18126.
9. Lam D. S. C. et al. TGF β -induced factor: a candidate gene for high myopia //Investigative ophthalmology & visual science. – 2003. – Т. 44. – №. 3. – С. 1012-1015.
10. Lin H. J. et al. Sclera-related gene polymorphisms in high myopia //Molecular vision. – 2009. – Т. 15. – С. 1655.
11. McBrien N. A. Regulation of scleral metabolism in myopia and the role of transforming growth factor-beta //Experimental eye research. – 2013. – Т. 114. – С. 128-140.
12. Metlapally R., Wildsoet C. F. Scleral mechanisms underlying ocular growth and myopia // Progress in molecular biology and translational science. – Academic Press, 2015. – Т. 134. – С. 241-248.
13. Meng B. et al. The association of TGFB1 genetic polymorphisms with high myopia: a systematic review and meta-analysis // International journal of clinical and experimental medicine. – 2015. – Т. 8. – №. 11. – С. 20355.
14. Morgan, I. G., Kyoko O. M, and Seang-Mei S. Myopia // The Lancet 379.9827. – 2012. – С. 1739-1748.
15. Ohno-Matsui K. Sclera-Targeted Therapies for Pathologic Myopia //Pathologic Myopia. – Springer, New York, NY, 2014. – С. 353-360.
16. Rasool S. et al. Contribution of TGF β 1 codon 10 polymorphism to high myopia in an ethnic Kashmiri population from India // Biochemical genetics. – 2013. – Т. 51. – №. 3-4. – С. 323-333.
17. Sandhya A. et al. TGFB1 codon 10 polymorphism and its association with the development of myopia: a case-control study // Biol Med. – 2011. – Т. 3. – №. 4. – С. 18-24.
18. Shah R., Hurley C. K., Posch P. E. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF- β 1 expression due to the common SNP- 509C-T (c.- 1347C>T) // Human genetics. – 2006. – Т. 120. – №. 4. – С. 461-469.
19. Summers J. A. The Sclera and Its Role in Regulation of the Refractive State // Pathologic Myopia. – Springer, New York, NY, 2014. – С. 59-74.

Поступила 03.08.2018

Полиморфизм гена rs1800469 TGF- β 1 у детей с разной степенью миопии

Малачкова Н. В., Яценко Д. А., Людкевич Г. П., Шкарупа В. М.

Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова; Винница (Украина)

TGF- β является одним из важных медиаторов регуляции изменений структуры внеклеточного матрикса склеры. Проведено исследование особенностей распределения полиморфных вариантов rs1800469 гена TGF- β 1 у детей Подольского региона Украины с миопией различной степени. Впервые показано, что в европейской популяции генотип CC

(rs1800469) ассоциируется с повышенным риском развития миопии высокой степени (ОШ = 2.47, 95% ДИ%: 0,97 - 6.27, $p = 0,02$). Достоверных различий в частотах алелей и распределении генотипов по исследованным полиморфным маркерам между детьми-эметропами и детьми с миопией слабой и средней степени не обнаружено.

Ключевые слова: миопия, склера, TGF- β 1, полиморфизм