

На правах рукописи



Кинкулькина Алия Ряшидовна

**Исследование молекулярно-генетических особенностей врожденного иммунного ответа
при первичной открытоугольной глаукоме**

3.2.7. Иммунология

3.1.5. Офтальмология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Свитич Оксана Анатольевна

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Гаврилова Татьяна Валериевна

Официальные оппоненты:

Карлова Елена Владимировна – доктор медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Самарская областная клиническая офтальмологическая больница имени Т.И. Ершевского», заместитель главного врача по инновационно-технологическому развитию

Маркелова Елена Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра нормальной и патологической физиологии, заведующая кафедрой

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «21» января 2025 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <https://sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Глаукома является нейродегенеративным заболеванием и ведущей причиной необратимой слепоты во всем мире. По данным официальной Федеральной статистики в Российской Федерации в 2023 г. зарегистрировано 1,3 миллиона пациентов с глаукомой. В течение длительного периода глаукома стабильно занимает лидирующее место среди причин инвалидности по зрению (Дымочка и соавт., 2022). По мнению некоторых авторов, ожидаемая распространенность глаукомы в Российской Федерации к 2025 г. составит от 1202,1 до 1408,5 (минимальный и максимальный прогнозы) на 100 тысяч взрослого населения (Малишевская и соавт., 2020). При этом во всем мире глаукомой страдают более 70 миллионов человек. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, к 2040 году количество больных глаукомой в мире увеличится до 111,8 миллионов (Tham et al., 2014). Наиболее распространенным типом глаукомы является первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ), в основе патогенеза которой лежит повышение внутриглазного давления (ВГД) (Загидуллина и соавт., 2015). В последние годы обсуждается роль особенностей иммунной защиты глаза при данном заболевании (Tsai et al., 2019).

Орган зрения обладает иммунной привилегированностью, которая представляет собой комплекс механизмов, направленных на предотвращение повреждающего действия воспаления с целью защиты и сохранения функции. Иммунная привилегия глаза имеет три уровня защиты: гематоофтальмологический барьер, наличие иммуносупрессивной среды, иммунное отклонение, связанное с передней камерой глаза (Vendomele et al., 2017).

Хотя повышенное ВГД, пожилой возраст, наследственность являются главными причинами возникновения и развития ПОУГ, точные механизмы, с помощью которых аксоны ганглиозных клеток сетчатки повреждаются и дегенерируют, неизвестны, и все большее количество авторов указывает на решающую роль нейровоспаления при глаукоме (Тикунова и соавт., 2013).

В сетчатке и зрительном нерве выделяют три типа резидентных глиальных клеток (астроциты, клетки Мюллера и микроглия), которые участвуют в развитии воспалительной реакции (Wang et al., 2017). На сегодняшний день активно обсуждаются особенности рецепторного аппарата и сигнальные пути при глаукоме. Наиболее изученными паттерн-распознающими рецепторами (PRRs) при глаукоме являются RAGEs рецепторы и семейство Toll-подобных рецепторов (TLRs), среди которых наиболее распространенными считаются TLR2 и TLR4 (Ioannidis et al., 2013). В результате хронического компрессионного стресса, вызванного повышенным уровнем ВГД, ишемии и других механизмов, PRRs идентифицируют

молекулярные структуры, связанные с повреждением – DAMPs (Damage-associated molecular patterns) (Takeuchi et al., 2010). Наиболее изученными при глаукоме DAMPs на сегодняшний день являются белки теплового шока (HSPs), алармин –HMGB1 (от англ. high-mobility group protein B1), окислительно модифицированные молекулы (белки) (Huang et al., 2007). После этого запускается провоспалительный ответ через индукцию сигнального каскада с участием нуклеарного фактора транскрипции (NF-κB), что ведет к усиленной экспрессии TNFα, про-IL-1β, IL-6, IL-12, про-IL-18 (Xu et al., 2016).

В последние годы уделяется внимание патогенетической роли инфламмасом при глаукоме, поскольку последовательная активация и олигомеризация инфламмасомного комплекса ведет к процессингу провоспалительных цитокинов и продукции зрелых форм медиаторов воспаления (Takagi et al., 2017). Однако, точных данных о влиянии инфламмасы NLRP3 на патогенез глаукомы недостаточно.

Недавние исследования показывают, что важную роль в регуляции кровообращения микроциркуляторного русла внутренних оболочек глаза и диска зрительного нерва (ДЗН) играют оксид азота (NO) и эндотелин (Dvoriantchikova et al., 2011). По данным литературы у больных с ПОУГ наблюдается дисрегуляция и нарушение синтеза оксида азота и эндотелина (Schallenberg et al., 2012).

Несмотря на большой интерес, проявляемый к данной проблеме, на текущий момент представлены исследования, направленные в основном на один из вышеупомянутых аспектов, в то время как взаимное их влияние при ПОУГ практически не изучено, мало данных о связи с тяжестью заболевания. В связи с этим становится целесообразным изучение взаимного влияния факторов врожденного иммунитета, белковые молекулы которых участвуют в реакциях локального воспаления, окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции, с риском развития первичной открытоугольной глаукомы в зависимости от стадии исследуемой патологии.

Степень разработанности темы исследования

Доказанным фактором риска при глаукоме является повышенное внутриглазное давление. В последние годы появляется все больше работ о связи нейродегенеративных изменений при ПОУГ с локальным воспалением. В единичных экспериментальных исследованиях получены данные об активации инфламмасом NLRP1, NLRP3 при глаукоме. Отдельно разрабатывается тема влияния оксид азота и эндотелина в регуляции кровообращения микроциркуляторного русла внутренних оболочек глаза и диска зрительного нерва.

Поскольку продукты, образующиеся в результате эндотелиальной дисфункции, окислительного стресса, могут действовать как медиаторы воспаления, активируя факторы

врожденного иммунного ответа, в том числе инфламмосомного комплекса, актуально проведение комплексного исследования роли взаимного влияния данных факторов.

Цель и задачи исследования

Цель - изучить ассоциацию экспрессионных и полиморфных маркеров в генах факторов, белковые молекулы которых участвуют в активации инфламмосомного комплекса, окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции, с риском развития первичной открытоугольной глаукомы.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи исследования:

1. Изучить локальную экспрессию генов, кодирующих белки инфламмосомного комплекса *NLRP3* (*NLRP3*, *CASP1*) в экспериментальной модели дегенерации сетчатки на кроликах.
2. Исследовать ассоциацию полиморфных маркеров *rs7525979* гена *NLRP3*, *rs530537* в гене *CASP1* с риском возникновения ПОУГ.
3. Оценить связь полиморфных маркеров *T786C* (*rs2070744*), *C774T* (*rs1549758*), *Glu 298Asp* (*rs1799983*) гена *eNOS* с риском возникновения ПОУГ.
4. Исследовать ассоциацию полиморфного маркера *rs5351* гена рецептора эндотелина-1 В-типа (*EDNRB*) с риском развития ПОУГ.
5. Разработать прогностическую панель маркеров при ПОУГ.

Научная новизна

Впервые показано, что увеличение экспрессии компонентов инфламмосомного комплекса *NLRP3* (*NLRP3* и *CASP1*) связано с дегенерацией сетчатки на модели *in vivo*.

Впервые проведена комплексная оценка факторов врожденного иммунитета и показано взаимообуславливающее влияние при ПОУГ инфламмосомного комплекса *NLRP3*, как медиатора воспаления в иммунной системе глаза, и факторов, участвующих в процессе окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции.

Впервые определены прогностические и протективные маркеры *rs7525979* в гене *NLRP3*, *rs530537* в гене *CASP1*, *T786C* (*rs2070744*), *C774T* (*rs1549758*), *Glu 298Asp* (*rs1799983*) в гене *eNOS* и *rs5351* в гене *EDNRB*, ассоциированные с развитием различных стадий ПОУГ.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенного исследования определены новые возможные молекулярные механизмы патогенеза ПОУГ, которые могут найти применение при поиске новых предикторов других нейродегенеративных заболеваний глаз.

Полученные данные о связи полиморфизма генов *NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB* на развитие глаукомного процесса могут быть использованы в качестве прогностических маркеров, ассоциированных с данным заболеванием.

В результате исследования разработана панель диагностических маркеров (*NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB*), которая позволит выявлять ранние изменения органа зрения при ПОУГ и корректировать тактику дальнейшего ведения пациента.

Методология и методы исследования

Методологической основой проведенного исследования являлись работы в области изучения молекулярных основ иммунного ответа при первичной открытоугольной глаукоме.

В данной научно-квалификационной работе использовался общеклинический принцип по выявлению пациентов с диагнозом ПОУГ с применением офтальмологических методов обследования: визометрия, биомикроскопия, периметрия, электрофизиологическое исследование, тонометрия по Маклакову, офтальмоскопия, гониоскопия. Методы исследования включали сбор биологического материала (цельная кровь), молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция в режиме реального времени с обратной транскрипцией). Результаты, полученные в ходе исследования, регистрировались и подвергались статистической обработке. С целью доказательства заявленных гипотез, количественные и статистические данные представлены в виде таблиц и графиков.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в получении исходных данных и проведении научных экспериментов, личное участие в апробации результатов исследования, обобщении данных литературы, обработке полученных результатов и написании основных публикаций по выполненной работе. Личный вклад автора состоит в самостоятельном дизайне диссертационного исследования и выполнении всех лабораторных исследований, обработке и статистическом анализе полученных результатов, а также непосредственном написании самой работы. Проведён подбор мРНК для определения экспрессии генов *NLRP3*, *CASP1* у кроликов и полиморфизма генов *NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB*. Подобраны условия для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала и проведения ПЦР-РВ. Выполнена оценка уровня экспрессии генов *NLRP3*, *CASP1* на модели *in vivo* (кролики с дегенерацией сетчатки). Полученные результаты сопоставлены с данными полиморфизма тех же генов у пациентов с ПОУГ. Также изучены ассоциативные связи полиморфизма генов *eNOS*, *EDNRB* у пациентов с ПОУГ.

Положения, выносимые на защиту

1. Компоненты инфламмосомного комплекса *NLRP3* играют значимую роль в иммунопатогенезе ПОУГ: в экспериментальной модели установлено достоверное увеличение уровня локальной экспрессии генов, кодирующих белки *NLRP3* и *CASP1*; у пациентов с ПОУГ обнаруживается статистически значимая ассоциация распределения аллелей и генотипов полиморфных маркеров *rs7525979* гена *NLRP3*, *rs530537* гена *CASP1*.

2. Полиморфные маркеры *T786C (rs2070744)*, *C774T (rs1549758)*, *Glu 298Asp (rs1799983)* в гене *eNOS* и *rs5351* в гене *EDNRB* являются прогностическими показателями при оценке риска развития ПОУГ.

3. Созданная прогностическая панель маркеров в генах эффекторных молекул врожденного иммунитета (*NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB*) позволяет оценить риск развития ПОУГ и провести раннюю диагностику заболевания до наступления необратимых клинических проявлений.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Результаты проведенного исследования соответствуют пункту №1 паспорта специальности 3.2.7. Иммунология: «фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, и функционирования иммунной системы, ее онто- и филогенеза», пункту №2: «изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии» и пункту №6: «разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов». Результаты проведенного исследования соответствуют пункту №1 паспорта специальности 3.1.5. Офтальмология: «изучение патогенеза, разработка и экспериментальное моделирование глазной патологии», пункту №2: «усовершенствование известных и разработка новых методов диагностики органа зрения и его придаточного аппарата» и пункту №3 «разработка методов профилактики заболеваний глаза и его придаточного аппарата».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов базируется на достаточном объеме клинического материала (количество пациентов всего 238 человек), тщательном подходе к выбору лабораторных методов исследования, а также применением статистических методов обработки полученных результатов. Сформулированные выводы и практические рекомендации отражают результаты проделанной работы и согласуются с поставленными целью и задачами исследования. Диссертация апробирована на заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. А.А. Воробьева Института общественного здоровья им. Ф.Ф. Эрисмана ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), протокол № 01 от 19 августа 2024 года.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научных конференциях: Научная конференция молодых ученых с международным участием «New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology» в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета (Москва, 11-12 марта 2020 года); Международная научная конференция экспертов, молодых ученых и специалистов, посвященная актуальным вопросам микробиологии, вирусологии, иммунологии и эпидемиологии в

диагностике, лечении и профилактике инфекционных и неинфекционных заболеваний (Москва, 3-4 июня 2022 года); Восьмая научно-практическая школа-конференция «Аллергология и клиническая иммунология для практикующих аллергологов-иммунологов, инфекционистов, педиатров, терапевтов и гинекологов» (Сочи, 2-8 октября 2022 года); Научно-практическая конференция офтальмологов Пермского края «Актуальные вопросы глаукомы» (Пермь, 31 марта 2023 года); Девятая научно-практическая школа-конференция «Аллергология, клиническая иммунология и инфектология для практикующих врачей» (Сочи, 1-7 октября 2023 года); Научно-практическая конференция с международным участием «XVII Российский Общенациональный Офтальмологический Форум» (РООФ 2024) (Москва, 25–27 сентября 2024 года).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты научно-квалификационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии им. А.А. Воробьева Института общественного здоровья им. Ф.Ф.Эрисмана Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) акт № 341 от 09.01.2024.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, отражающих содержание диссертации: 2 кратких сообщения, 3 оригинальные статьи в рецензируемых журналах ВАК при Минобрнауки России, 2 из них во включенных в перечень Scopus, 5 в сборниках тезисов Российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, 7 приложений. Работа иллюстрирована 12 таблицами (из них 7 в Приложениях), 42 рисунками (из них 1 в Приложении). Библиографический список включает 195 источников, в том числе 36 отечественных, 159 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Характеристика клинических групп. Клиническим материалом служила периферическая кровь 238 пациентов с офтальмологической патологией, которая была предоставлена кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО Пермского государственного медицинского

университета им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России. Все пациенты подписывали добровольное согласие на участие в исследовании.

Основную группу составили 141 пациент с первичной открытоугольной глаукомой, среди которых 77 мужчин и 64 женщины в возрасте от 55 до 89 лет (средний возраст 71 год \pm 7,5). В зависимости от стадии заболевания сформированы 4 подгруппы, при этом пациентов с двусторонним процессом различных стадий относили в группу по худшему глазу с более продвинутой стадией ПОУГ: 1-ая подгруппа – пациенты с I стадией заболевания – 31 человек; 2-ая – со II стадией – 33 человека; 3-я – с III стадией – 50 человек; 4-ая – с IV стадией – 27 человек. Зрительные функции соответствовали стадии глаукомного процесса. Группу сравнения составили 97 человек, у которых была возрастная катаракта различной степени зрелости и отсутствовали признаки глаукомы. По полу и возрасту группы были сопоставимы.

В процессе сбора анамнеза из 141 обследованного пациента с глаукомой данные о наличии или отсутствии наследственности смогли предоставить 60 человек (43%). Об отсутствии глаукомы у ближайших родственников сообщил 51 пациент (85%). На наличие отягощенной наследственности по глаукоме у ближайших родственников указали 9 человек (15%), при этом у 8 – по материнской линии, у 1 – по отцовской линии.

Клинико-anamnestические данные пациентов. В процессе сбора анамнестических данных был проведен анализ *anamnesis vitae* и *anamnesis morbi* – наличие у ближайших родственников глаукомы. Детально изучались особенности течения заболевания у каждого участника исследования, наличие сопутствующей патологии. Все пациенты были жителями Пермского края.

Все пациенты с диагнозом ПОУГ находились на местном гипотензивном режиме: закапывали аналоги простагландинов, бета-адреноблокаторы, ингибиторы карбоангидразы, альфа-адреномиметики. Использовались как моно-препараты, так и фиксированные комбинации. Уровень ВГД колебался от 20 до 30 мм рт. ст. по Маклакову, не был целевым, пациенты поступали в отделения для лазерного или хирургического гипотензивного лечения.

Материалы. Материалом молекулярно-биологического исследования служили 28 образцов тканевого комплекса сетчатки/ретиального пигментного эпителия (ТК сетчатки/РПЭ), выделенные из глаз экспериментальных животных с дегенерацией сетчатки (14 кроликов, 14 глаз) и здоровых животных (7 кроликов, 14 глаз) согласно стандартным протоколам. Биоматериал переносился в криопробирки и хранился при температуре -70°C до проведения исследований.

Методы. **Схема моделирования дегенеративного поражения сетчатки у кролика.** Исследование выполнено с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве

Европейского Сообщества (86/609/ЕС), «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Кроликам породы новозеландских альбиносов (14 животных опытная группа: возраст 2,5-3,0 мес., вес 2,0-2,5 кг) моделировали дегенеративное поражение сетчатки, однократным введением в субретинальное пространство на расстоянии 1-1,5 мм книзу от диска зрительного нерва 0,01 мл 0,9% раствора хлорида натрия с формированием субретинального пузыря согласно методике, разработанной в Отделе патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России [Нероев и соавт., 2021]. Предоперационная подготовка животных включала внутримышечное введение обезболивающих препаратов 0,3 мл золетила, 50 и 0,55 мл 2% ксилазина; также до операции вводились 0,3 мл 0,4% дексаметазона, 0,5 мл дицинона). О формировании дегенерации сетчатки судили на основании изменений морфофункциональных параметров, полученных при проведении специализированных офтальмологических методов исследования (оптической когерентной томографии, исследовании аутофлюоресценции глазного дна, электроретинографии) на сроках наблюдения 1, 3 и 6 мес. В указанные сроки животных выводили из эксперимента методом воздушной эмболии после введения в наркоз (согласно приказу МинВуза СССР №724 от 13.11.184), далее проводили энуклеацию глазных яблок.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение мРНК из образцов ТК сетчатки/РПЭ кроликов осуществляли с помощью набора Gene JET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Выделение геномной ДНК из биологических материалов людей (сыворотка крови) осуществляли сорбционным методом при помощи коммерческого набора «РИБО-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, АмплиСенс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Проверка качества выделенной РНК/ДНК осуществлялась с помощью спектрофотометра типа Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, США). Выделенные образцы РНК/ДНК хранили при температуре минус 70С.

Реакция обратной транскрипции и ПЦР-РВ. Для получения кДНК на матрице выделенной РНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора ОТ-1 фирмы «Синтол» (Россия) с присутствием ингибитора РНК-аз. Для определения полиморфных маркеров *rs2070744 T786C* гена *eNOS*, *rs1549758 C774T* гена *eNOS*, *rs1799983 Glu 298Asp* гена *eNOS* праймеры синтезированы фирмой Синтол (Россия). Праймеры для определения полиморфных маркеров *rs7525979* гена *NLRP3*, *rs530537 CASP1*, *rs5351* гена *EDNRB*, а также для определения экспрессии генов кроликов *NLRP3*, *CASP1* и нормировочного *GAPDH*, синтезированы в фирме ДНК-синтез (Россия). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали 2,5-кратную реакционную смесь, 2,5-кратный разбавитель, 10-кратный буфер для TagPol (концентрация $MgCl_2$ – 1,5-2 мМ, присутствие ионов NH_4^+), 10мМ смесь четырех

дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTPs), ДНК – полимеразы *Termus aquaticus* 5 Е/мкл (TagPol). Реакцию проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси. В отрицательный контроль реакций вместо кДНК добавляли 3 мкл H₂O (Синтол, Россия). Реакцию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя в амплификаторе ДТ-96 фирмы «ДНК-технология» (Россия). Программа амплификации для определения полиморфных маркеров *rs2070744 T786C* гена *eNOS*, *rs1549758 C774T* гена *eNOS*, *rs1799983 Glu 298Asp* гена *eNOS*: 1 цикл: 95⁰С – 3 минуты; 10 циклов: 95⁰С – 15 секунд, 60⁰С – 63⁰С – 40 секунд; 30 циклов: 95⁰С – 15 секунд; 63⁰С – 40 секунд (измерение флюоресценции). Программа амплификации для определения полиморфных маркеров *rs7525979* гена *NLRP3*, *rs530537* гена *CASP1*, *rs5351* гена *EDNRB*: 1 цикл: 95⁰С – 3 минуты; 40 циклов: 95⁰С – 10 секунд; 55⁰С – 30 секунд (измерение флюоресценции); 72⁰С – 35 секунд. В случае накопления ампликонов только в одной из реакций образец считался гомозиготным по соответствующему аллелю, а при детекции флюоресценции в обеих реакциях – гетерозиготным.

Статистическая обработка полученных результатов. Анализ и визуализацию полученных данных проводили с использованием компьютерной программы для статистической обработки данных – статистического пакета для социальных наук SPSS (Statistical Package for the Social Science). Учет и первичная обработка данных осуществлялись на базе приложения MS Excel из пакета офисных программ MS Office. Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Для определения относительного количества кДНК в образце использовали метод нормированной экспрессии $\Delta\Delta Ct$. Результаты выражали в относительных единицах (отн. ед.): отношение величины порогового цикла амплификации исследуемого гена к величине порогового цикла амплификации референсного гена (гена «домашнего хозяйства») GAPDH: $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ образца}) / (\Delta Ct \text{ GAPDH}) \times \text{ожидаемого явления}$ менее 10). Сравнение исследуемых факторов между двумя несвязанными группами исследования проводилось с помощью критерия Манна-Уитни. Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью критерия хи-квадрат Пирсона (при значениях ожидаемого явления более 10), точного критерия Фишера (при значениях ожидаемого явления менее 10). Результаты описаны с помощью отношения шансов (ОШ) и 95 % доверительного интервала для ОШ (ДИ). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка экспрессии генов NLRP3 и CASP1 в экспериментальной модели дегенерации сетчатки у кролика. На первом этапе научно-экспериментальной работы исследовали локальную экспрессию генов инфламмосомного комплекса NLRP3 (NLRP3, CASP-1) в образцах ТКС/ППЭ экспериментальных животных с дегенерацией сетчатки, в связи с тем, что эта

патология является сходной с глаукомным поражением сетчатки и может служить моделью для экспериментальных исследований данного заболевания.

В сетчатке глаз (n=14) здоровых животных и во всех случаях опытной группы (n=14) обнаружена экспрессия гена, кодирующего *NLRP3*. Уровень мРНК *NLRP3* в ТК экспериментальных животных с дегенерацией сетчатки был статистически значимо выше, чем таковой в норме, медиана его экспрессии составила 35,0 отн. ед. (таблица 1).

Таблица 1 – Анализ экспрессии генов компонентов инфламмосомного комплекса *NLRP3* (*NLRP3*, *Casp1*) в группах кроликов

Группа	Уровень экспрессии (отн.ед.)					
	<i>NLRP3</i>			<i>CASP1</i>		
	Me	Q ₁ – Q ₃	<i>p</i>	Me	Q ₁ -Q ₃	<i>p</i>
Здоровые (n=14)	16,5	10,0 – 23,0		0,0	-	
Дегенерация сетчатки (n=14)	35,0	10,0 – 37,0	< 0,001*	38,0	13,0 – 39,0	< 0,001*

Примечание: n – количество глаз; * – $p \leq 0,05$.

При изучении экспрессия гена, кодирующего *CASP1*, в ТК сетчатки/ППЭ животных основной группы и контроля ни в одном из исследуемых образцов здоровой сетчатки не обнаружено экспрессии гена *CASP1*, в отличие от материала экспериментальных животных, в ТК сетчатки/ППЭ которых медиана экспрессионной активности составила 38,0 отн. ед ($p=0,001$).

Значительное повышение уровня мРНК *NLRP3* ($p<0,001$) в ТК сетчатки/ППЭ глаз экспериментальных животных, обнаруженное в нашем исследовании, свидетельствует об участии данного рецептора в развитии нейродегенеративного поражения сетчатки. Экспрессия гена, кодирующего *CASP1*, обнаруженная только в ТК сетчатки/ППЭ опытных глаз и отсутствующая в контроле, позволяет думать о наличии особых локальных механизмов, регламентирующих активность данного белка, а, следовательно, и воспалительной реакции в ткани здоровой сетчатки.

Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов белков инфламмосомного комплекса *NLRP3* (*NLRP3*, *CASP1*) с риском развития ПОУГ. На следующем этапе работы была исследована частота встречаемости аллелей и генотипов генов *NLRP3* и *CASP1* в сыворотке крови в группе пациентов с ПОУГ, проживающих в Пермском крае. Оценка уровней экспрессии генов *NLRP3* и *CASP1* в образцах сыворотки крови проводилась методом ПЦР-РВ. При изучении полиморфного маркера *rs7525979* гена *NLRP3* было выявлено, что аллель *T* достоверно чаще встречается в группе пациентов с ПОУГ относительно группы сравнения ($p=0,001$, OR= 3,16, CI=1,62-6,13) и увеличивает риск развития патологии в 3,16 раза. Распределение генотипов также показало разницу между основной группой и группой сравнения: гетерозигота *TC* была ассоциирована с ПОУГ и увеличивала риск развития патологии в 2,88 раза относительно группы

сравнения (частота 0,17 и 0,42; $p < 0,01$; $OR = 2,835$; $95\%CI = 1,429-5,627$). Гомозиготный генотип *CC* (частота 0,82 и 0,52; $p = 0,01$; $OR = 0,41$; $95\%CI = 0,246-0,708$), наоборот, значительно чаще встречался в группе сравнения, играя протективную роль в развитии патологии. Данные представлены на рисунке 1.

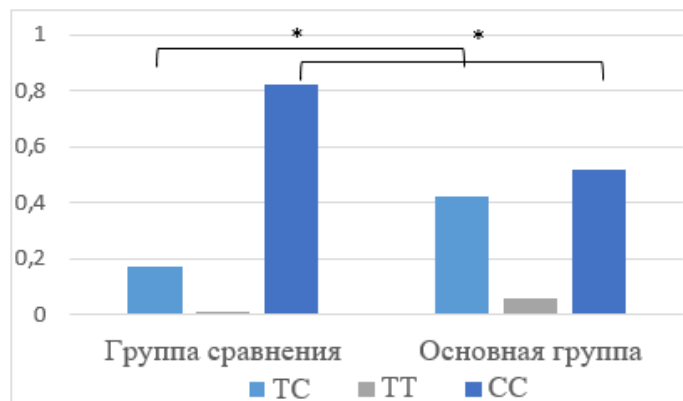


Рисунок 1 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs7525979* в гене *NLRP3* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов (* $p \leq 0,05$)

Согласно общепринятой классификации, выделяют четыре стадии заболевания, при прогрессировании которых ухудшается клиническая картина ПОУГ. В связи с этим можно предположить, что ассоциация полиморфных маркеров генов врожденного иммунитета, в том числе инфламмосомного комплекса *NLRP3* (*NLRP3*, *CASP1*), будет изменяться в зависимости от тяжести глаукомного процесса. При исследовании полиморфного маркера *rs7525979* гена *NLRP3* в зависимости от стадии ПОУГ были обнаружены статистически достоверные различия для аллелей. Выявлено, что аллель *T* увеличивает риск развития ПОУГ IV стадии в 9 раз (частота 0,16 и 0,58; $p < 0,001$, $OR = 9,839$, $95\%CI = 3,579-27,053$), аллель *C* играет проекторную роль для I, II и III стадий ПОУГ ($p < 0,001$) относительно группы сравнения. Гетерозиготный генотип увеличивает риск развития ПОУГ I стадии в 3 раза ($p = 0,01$, $OR = 3,253$, $95\%CI = 1,588-6,662$), II и III стадии – в 2 раза ($p = 0,033$, $OR = 2,182$, $95\%CI = 1,013-4,698$), ($p = 0,010$, $OR = 2,982$, $95\%CI = 1,342-6,627$), IV стадии – в 12 раз ($p < 0,001$, $OR = 12,319$, $95\%CI = 4,292-35,355$) относительно группы сравнения. Гомозигота *CC* играет протективную роль в развитии ПОУГ всех стадий ($p < 0,05$). Обнаружено, что аллель *C* значительно чаще встречается при глаукоме III стадии ($p < 0,0001$; $OR = 2,974$; $95\%CI = 1,819-4,9$) по сравнению с группой пациентов со II стадией. При сравнении групп пациентов с III и IV стадиями выявлено, что аллель *C* значительно чаще встречался у пациентов с III стадией и играл протективную роль для пациентов с IV стадией заболевания ($p < 0,018$; $OR = 0,1$; $95\%CI = 0,009-0,66$). При сравнении групп пациентов с I, II, III стадиями относительно IV

стадии было выявлено, что аллель *T* чаще встречался у пациентов с I, II, III стадиями и играл протективную роль для IV стадии ПОУГ (рисунок 2).

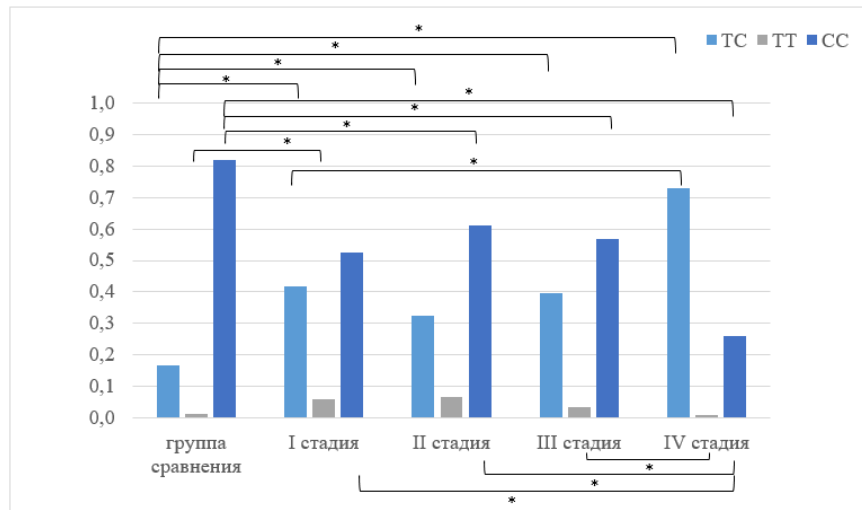


Рисунок 2 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs7525979* в гене *NLRP3* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов (* $p \leq 0,05$)

При сравнении групп пациентов с ПОУГ I, II, III стадиями относительно IV стадии заболевания выявлено, что гомозиготный генотип *CC* увеличивает риск развития I стадии ПОУГ в 2 раза (частота 0,52 и 0,26; $p < 0,0273$; $OR = 2,991$; $95\% CI = 1,168-7,507$), II стадии – в 4 раза (частота 0,61 и 0,26; $p < 0,032$; $OR = 4,252$; $95\% CI = 1,551-10,61$), III стадии – в 3 раза (частота 0,57 и 0,26; $p < 0,0174$; $OR = 3,583$; $95\% CI = 1,361-9,014$). Генотип *CC* значительно чаще встречался в группе пациентов с IV стадией и играл протективную роль для I стадии ПОУГ (частота 0,42 и 0,73; $p < 0,0076$; $OR = 0,264$; $95\% CI = 0,105-0,679$).

При исследовании полиморфного маркера *rs530537* гена *CASP1* обнаружено, что аллель *T* достоверно чаще встречается в группе пациентов с ПОУГ относительно группы сравнения ($p = 0,017$, $OR = 2,738$, $CI = 1,16-6,38$) и увеличивает риск развития патологии в 2,74 раза, генотип *CC* (частота 0,48 и 0,52; $p = 0,017$; $OR = 0,36$; $95\% CI = 0,157-0,855$) играет протективную роль (рисунок 3).

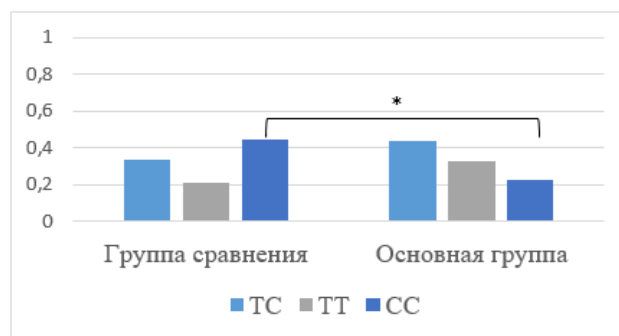


Рисунок 3 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs530537* в гене *CASP1* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов (* $p \leq 0,05$)

При исследовании полиморфного маркера *rs530537* гена *CASP1* в зависимости от тяжести ПОУГ обнаружено, что аллель *T* увеличивает риск развития ПОУГ I и II стадий в 2 раза ($p < 0,028$, $OR = 2,732$; $95\%CI = 1,169-6,383$) ($p < 0,039$, $OR = 2,833$, $95\%CI = 1,145-7,009$), III стадии – в 3 раза ($p < 0,029$, $OR = 3,238$, $95\%CI = 1,186-8,842$), IV стадии – в 4 раза ($p < 0,023$; $OR = 4,857$, $95\%CI = 1,223-19,295$) относительно группы сравнения, гомозигота *CC* играет протективную роль для ПОУГ всех стадии ($p < 0,05$) (рисунок 4).

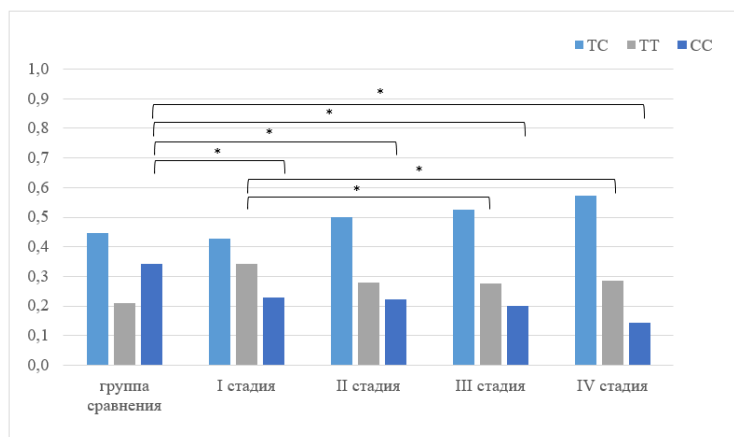


Рисунок 4 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs530537* гена *CASP1* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов ($*p \leq 0,05$)

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфным локусам *T786C* гена *eNOS* среди пациентов с ПОУГ. Нами было проведено исследование ассоциации полиморфных маркеров гена *eNOS* с риском развития первичной открытоугольной глаукомы у жителей Пермского края. При анализе частоты встречаемости аллелей гена *eNOS* по полиморфному локусу *T786C* было выявлено, что у пациентов с ПОУГ аллель *C* играет протективную роль, так как наблюдалось достоверное снижение встречаемости данного аллеля относительно группы сравнения ($p = 0,013$). При исследовании распределения генотипов того же маркера у пациентов с ПОУГ установлено достоверное повышение частоты встречаемости гомозиготного генотипа *TT* по сравнению с контрольной группой ($p = 0,039$). При этом шанс развития ПОУГ в 2,12 раза был выше относительно группы сравнения (ДИ: 0,88 -5,257). Кроме того, выявлено, что гетерозиготный генотип *TC* для пациентов с ПОУГ играл протективную роль, различия были статистически значимыми ($p = 0,027$, $ОШ = 0,436$, $ДИ = 0,14 -0,853$). Данные представлены на рисунке 5.

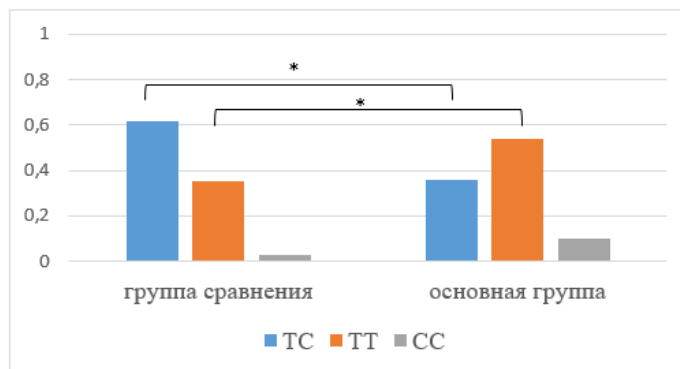


Рисунок 5 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *T786C* гена *eNOS* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов

При изучении полиморфного маркера *T786C* гена *eNOS* в зависимости от стадии ПОУГ было выявлено, что аллель *C* играет протективную роль для пациентов с ПОУГ I стадии ($p=0,013$, $OR=0,47$, $CI=0,26-0,84$), со ПОУГ II стадией ($p=0,026$, $OR=0,53$, $CI=0,292-0,961$). Анализ распределения частоты встречаемости генотипов полиморфного маркера *T786C* гена *eNOS* в зависимости от стадии ПОУГ показал, что гомозигота *TT* увеличивает риск развития ПОУГ I стадии в 2 раза ($p=0,013$; $OR=2,125$; $95\%CI=1,185-3,810$) и II стадии в 1,8 раза ($p=0,026$; $OR=1,88$; $95\%CI=1,040-3,428$) относительно группы сравнения (рисунок 6).

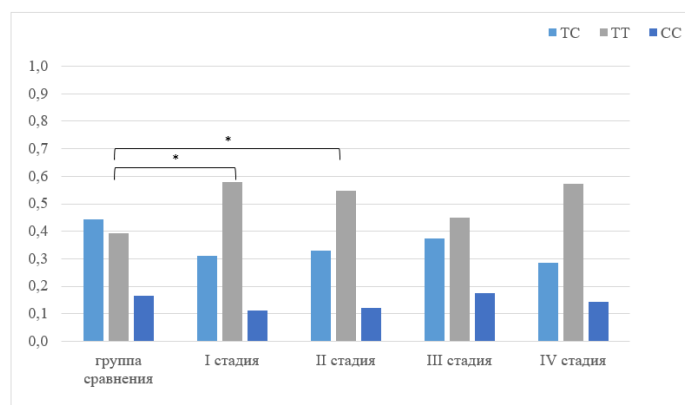


Рисунок 6 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *T786C* гена *eNOS* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов (* $p \leq 0,05$)

При изучении полиморфного маркера *C774T* и *Glu298Asp* гена *eNOS* при ПОУГ и в зависимости от стадии заболевания статистически достоверные данные получены не были ($p > 0,05$).

Распределение частот гаплотипов по полиморфным маркерам гена *eNOS* среди пациентов с ПОУГ. Кроме анализа однонуклеотидных генотипов актуальным является исследование ассоциации гаплотипов гена *eNOS* с развитием ПОУГ и ее стадий. При

исследовании распределения частот гаплотипов в полиморфных маркерах *T786C* (*rs 2070744*) и *C774T* (*rs 1549758*) гена *eNOS* нами было показано, что у пациентов с гаплотипом *TCTC* ПОУГ развивалась значительно реже, таким образом вышеуказанный гаплотип можно считать «протективным» (частоты 0,17 в основной группе и 0,35 в группе сравнения, $p = 0,03$ ОШ= 0,382, ДИ= 0,135-1,083). При исследовании распределения остальных гаплотипов данных полиморфных маркеров достоверных различий не найдено ($p > 0,05$). При исследовании распределения частот гаплотипов по полиморфным локусам *T786C* (*rs2070744*) и *Glu298Asp* (*rs1799983*) гена *eNOS* нами было показано, что у пациентов с гаплотипом *TCTT* ПОУГ развивалась значительно реже, таким образом вышеуказанный гаплотип можно считать «протективным» (частоты 0,09 в основной группе, 0,27 в группе сравнения, $p = 0,02$, ОШ= 0,285, ДИ= 0,082-0,988). При исследовании распределения остальных гаплотипов данных полиморфных маркеров достоверных различий не найдено. При исследовании распределения частот гаплотипов по полиморфным локусам *C774T* и *Glu298Asp* гена *eNOS* нами было показано, что у пациентов с данными гаплотипами достоверных различий не найдено ($p > 0,05$). При исследовании распределения частот гаплотипов по полиморфным локусам *T786C* (*rs2070744*), *C774T* (*rs1549758*), *Glu298Asp* (*rs1799983*) гена *eNOS* нами было показано, что у пациентов с гаплотипом *TTTTTT* ПОУГ развивалась значительно чаще, увеличивая риск развития заболевания в 2 раза (частоты 0,16 и 0,31, $p = 0,025$, ОШ= 2,286, ДИ= 1,138-4,593). При исследовании распределения остальных гаплотипов данных полиморфных маркеров достоверных различий не найдено.

При исследовании распределения частот гаплотипов по полиморфным локусам *T786C*, *C774T*, *Glu298Asp* гена *eNOS* в зависимости от стадии ПОУГ нами было показано, что у пациентов с гаплотипом *TTTTTT* ПОУГ II стадии развивалась значительно чаще, увеличивая риск развития заболевания в 4 раза (частоты 0,16 и 0,45, $p = 0,003$ ОШ= 4,169, ДИ= 1,716-10,128), при этом гаплотип *TTTCCC* наоборот играл протективную роль для той этой группы пациентов относительно группы сравнения ($p = 0,012$).

При сравнении групп пациентов с первой и третьей стадией ПОУГ было показано, что гаплотипы *TTTTCC* и *TCTTTC* у пациентов с ПОУГ I стадии наблюдался с частотой 0,11, при ПОУГ III стадии не встречался, соответственно был ассоциирован с риском возникновения I стадии ПОУГ ($p \leq 0,05$). При сравнении групп пациентов со второй и третьей стадиями ПОУГ было выявлено, что гаплотип *TTTTTT* встречался с частотой 0,45 при II стадии и 0,2 при третьей, играя протективную роль для пациентов с III стадией ПОУГ ($p = 0,041$). При этом гаплотип *TCTCTC* увеличивал риск развития ПОУГ III стадии в 6,8 раза (частоты 0,03 и 0,19, $p = 0,046$, ОШ=6,857, ДИ= 0,811-58,008).

При сравнении групп пациентов со второй и четвертой стадиями ПОУГ показано, что он встречался только у пациентов в IV стадией ПОУГ, играя протективную роль для пациентов со второй стадией ($p=0,033$, $ОШ=0,162$, $ДИ=0,078-0,337$). При исследовании распределения остальных гаплотипов достоверных различий не найдено. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение частот гаплотипов по полиморфным локусам *T786C*, *C774T*, *Glu298Asp* гена *eNOS* среди пациентов с ПОУГ

Гаплотипы	Группа сравнения	Основная группа	Стадии основной группы			
			I стадия	II стадия	III стадия	IV стадия
TT/TT/TT	0,16	0,31	0,37	0,45*	0,2***	0,29
CC/CC/CC	0,02	0,03	0	0,03	0,04	0
TC/TC/TC	0,15	0,1	0	0,03	0,19***	0
TT/TT/CC	0,05	0,01	0,11**	0	0	0
TT/TT/TC	0,02	0,05	0,11	0,06	0,04	0
TT/CC/CC	0,01	0,01	0	0,03	0	0
TT/TC/TC	0,08	0,14	0,22	0,09	0,14	0,29
TT/CC/TC	0,01	0,01	0	0	0	0
TT/CC/TT	0	0	0	0	0	0
TT/TC/CC	0	0,02	0	0,07*	0	0
TT/TC/TT	0,03	0,01	0	0	0,02	0
CC/CC/TC	0,01	0,01	0	0	0	0
CC/TC/TC	0,05	0,05	0	0	0,09	0,14****
CC/CC/TT	0,02	0,01	0	0	0	0
CC/TT/TT	0,02	0,01	0	0	0,02	0
CC/TT/TC	0,01	0,01	0	0	0	0
CC/TC/TT	0,02	0,01	0	0	0,02	0
CC/TT/CC	0	0	0	0	0	0
CC/TC/CC	0,01	0,01	0	0	0	0
TC/TC/CC	0,02	0,02	0	0,03	0,02	0
TC/CC/TC	0,01	0,01	0	0	0,02	0
TC/CC/CC	0,01	0,02	0	0,03	0,02	0
TC/TT/TT	0,16	0,11	0	0,09	0,11	0,29
TC/TT/CC	0	0	0	0	0	0
TC/CC/TT	0	0,01	0	0	0	0
TC/TT/TC	0,04	0,03	0,11**	0,06	0	0
TC/TC/TT	0,04	0,01	0	0	0	0

Примечание: * При сравнении пациентов с ПОУГ II стадии относительно группы сравнения для гаплотипа *TTTTTT* $p=0,003$ $ОШ=4,169$, $ДИ=1,716-10,128$; для гаплотипа *TTTCCC* $p=0,012$, $ОШ=0,23$, $ДИ=0,167-0,317$; ** При сравнении пациентов с ПОУГ I стадии и ПОУГ III стадии для гаплотипа *TTTTCC* $p=0,05$, $ОШ=0,154$, $ДИ=0,081-0,291$; для гаплотипа *TCTTTC* $p=0,026$, $ОШ=0,154$, $ДИ=0,081-0,291$; *** При сравнении пациентов с ПОУГ II стадии и ПОУГ III стадии для гаплотипа *TTTTTT* $p=0,041$, $ОШ=0,312$, $ДИ=0,113-0,864$; для гаплотипа *TCTCTC* $p=0,046$, $ОШ=6,857$, $ДИ=0,811-58,008$; **** При сравнении пациентов с ПОУГ II стадии и ПОУГ IV стадии для гаплотипа *CCTCTC* $p=0,033$, $ОШ=0,162$, $ДИ=0,078-0,337$.

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфному локусу *rs 5351* гена *EDNRB* у пациентов с ПОУГ. При изучении полиморфного маркера *rs5351* гена *EDNRB* было выявлено, что аллель *A* ($p < 0,05$, ОШ= 0,494, ДИ=0,290-0,843) и гетерозиготный генотип ($p < 0,01$, ОШ= 0,4, ДИ=0,235-0,680) играют протективную роль. Гомозиготный генотип *GG* увеличивает риск развития ПОУГ в 2 раза ($p < 0,05$, ОШ= 2,113, ДИ=1,002-4,456) относительно группы сравнения (рисунок 7).

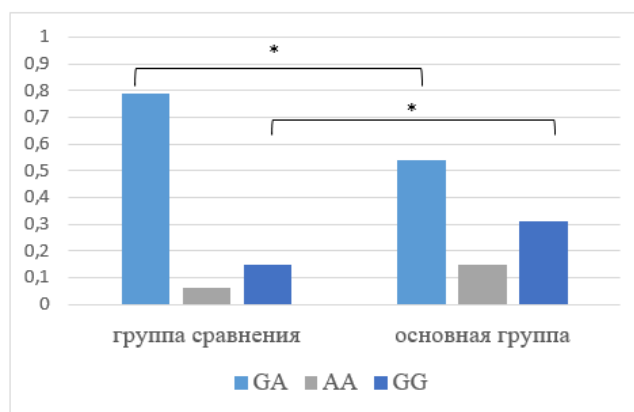


Рисунок 7 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs5351* гена *EDNRB* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов

При изучении распределения генотипов полиморфного маркера *rs5351* гена *EDNRB* в зависимости от стадии ПОУГ относительно группы сравнения было выявлено, что генотип *GG* увеличивает риск развития ПОУГ I стадии в 2,5 раза ($p < 0,019$, ОШ= 2,5, ДИ=1,171-5,464), II стадии в 2,7 раза ($p < 0,020$, ОШ= 2,73, ДИ=1,227-6,111), III стадии в 2,9 раза ($p = 0,018$, ОШ= 2,9, ДИ=1,238-6,834), IV стадии – в 7 раз ($p < 0,0001$, ОШ= 7,4, ДИ=2,68-20,459). Гетерозиготный генотип *GA* играет протективную роль для всех стадий ПОУГ ($p < 0,05$) (рисунок 8).

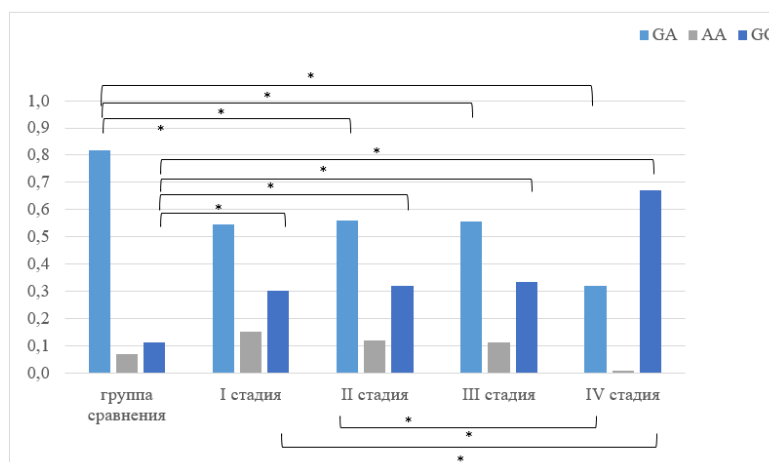


Рисунок 8 – Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs5351* гена *EDNRB* в исследуемых группах. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат – частота генотипов

Анализ распределения генотипов среди групп пациентов с ПОУГ I и IV стадиями показал, что аллель *A* значительно чаще встречается в группе пациентов с I стадией, увеличивая риск развития данной стадии заболевания в 2,9 раза относительно IV стадии (частота 0,45 и 0,33, $p=0,02$, ОШ=2,937, ДИ=1,137 – 7,168). Отмечено, что гомозиготный генотип *GG* увеличивает риск развития IV стадии в 2,9 раза (частота 0,30 и 0,67, $p=0,02$, ОШ=2,927, ДИ=1,137 – 7,168). Анализ распределения генотипов среди групп пациентов с ПОУГ II и III стадиями, а также II и IV стадиями показал, что генотип *GA* чаще встречается в группе пациентов со II стадией, играя протективную роль для III, IV стадий ($p<0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что ПОУГ на начальных стадиях протекает практически без клинических проявлений и поэтому нередко выявляется, когда затормозить развитие патологического процесса не представляется возможным. Заболевание характеризуется периодическим или постоянным повышением уровня ВГД выше индивидуальной нормы [Trivli et al., 2020]. Как следствие, развиваются структурные патологические изменения ДЗН, возникают соответствующие типичные дефекты полей зрения. Однако, в ряде случаев, заболевание развивается на фоне нормальных цифр ВГД, что обуславливает наличие других факторов развития ПОУГ.

В проведенной работе сформулировано положение о неразрывной связи процессов окислительного стресса, эндотелиальной дисфункции и патогенетических механизмов воспаления, обусловленного факторами врожденного иммунитета с образованием «порочного круга». Данные представлены на рисунке 9.

Для решения поставленных задач проведено исследование ассоциации экспрессионных и полиморфных маркеров в генах факторов, белковые молекулы которых участвуют в активации инфламмасом, окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции, с риском развития первичной открытоугольной глаукомы.

Таким образом, в настоящей работе представлены фундаментальные положения современного понимания иммунопатогенеза глаукомной нейрооптикопатии, а именно: 1) связь иммунопатогенеза ПОУГ с воспалительными процессами, в развитии которых участвуют факторы врожденного иммунитета; 2) взаимообуславливающее влияние одного из типов инфламмосомы, как медиатора воспаления в иммунной системе глаза, и факторов, участвующих в процессе окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции при глаукоме; 3) взаимосвязь между полиморфными маркерами *rs7525979* гена *NLRP3*, *rs530537* гена *CASP1*, *rs2070744 T786C*, *rs1549758 C774T*, *rs1799983 Glu 298Asp* гена *eNOS*, *rs5351* гена *EDNRB* с тяжестью ПОУГ.

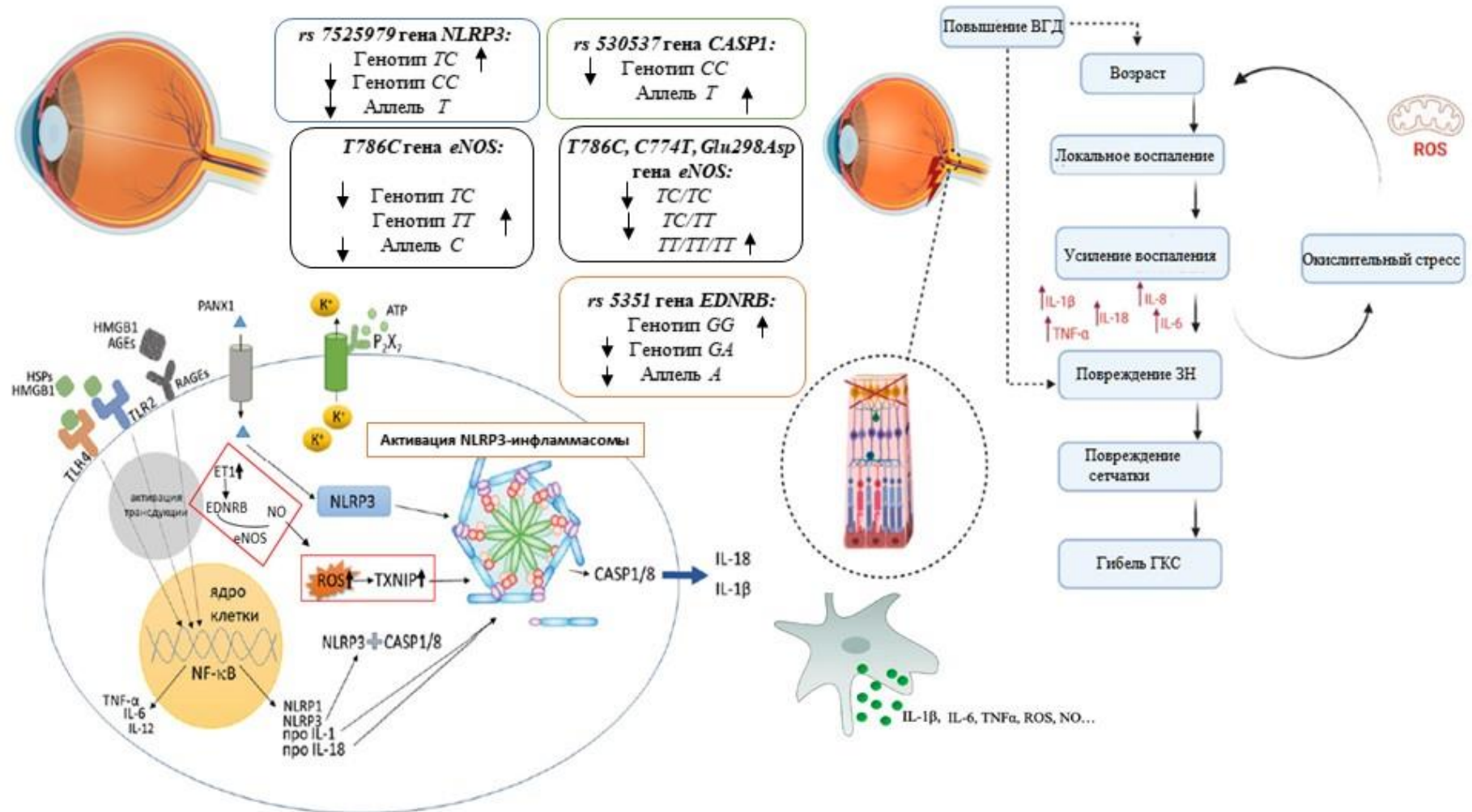


Рисунок 9 – Влияние генотипов и аллелей полиморфных маркеров *rs 7525979* в гене *NLRP3* и *rs 530537* в гене *CASP1*, *rs 2070744 T786C*, *rs 1549758 C774T*, *rs 1799983 Glu 298Asp* в гене *eNOS*, *rs 5351* гена *EDNRB* у пациентов с ПОУГ.

Полученные в работе данные могут использоваться в дальнейшем в качестве прогностических маркеров при ПОУГ, а также для ранней диагностики развития различных стадий заболевания. Кроме этого, результаты исследования могут быть теоретической основой в вопросах фармакотерапии глаукомы.

В перспективе планируется продолжить поиск предиктивных маркеров ПОУГ для расширения диагностической панели прогнозирования данного заболевания.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментальной модели дегенерации сетчатки на кроликах уровень экспрессии гена *NLRP3* в ТК экспериментальных животных с дегенерацией сетчатки был в 2 раза выше, чем таковой в норме; ни в одном из исследуемых образцов здоровой сетчатки не обнаружено экспрессии гена *CASP1*, в отличие от материала экспериментальных животных.

2. Выявлено, что у пациентов с ПОУГ аллель *T*, гетерозигота *TC* полиморфного маркера *rs7525979* гена *NLRP3* были ассоциированы с ПОУГ, увеличивая риск развития патологии в 3 и 2 раза соответственно; аллель *C* играет протективную роль для глаукомы на начальных стадиях, генотип *CC* – на всех стадиях ПОУГ. Аллель *T* полиморфного маркера *rs530537* гена *CASP1* увеличивает риск развития ПОУГ в 2 раза, усугубляя тяжесть течения заболевания, генотип *CC* играет протективную на всех стадиях патологии.

3. Обнаружена ассоциация гаплотипа *TTTTTT* и генотипа *TT* (полиморфного маркера *T786C – rs2070744*) гена *eNOS* с развитием ПОУГ, преимущественно на ранних стадиях заболевания. «Протективными» маркерами определены аллель *C* (чаще при I и II стадиях) и гетерозиготный генотип *TC*, а также гаплотипы *TCTC* (маркеров *T786C* и *C774T*), *TCTT* (маркеров *T786C* и *Glu298Asp*), *TTTCCC* гена *eNOS*.

4. Показано, что генотип *GG* (полиморфного маркера *rs5351* гена *EDNRB*) ассоциирован с риском развития ПОУГ, увеличивал риск развития патологии в 2 раза, способствуя прогрессированию заболевания, «протективными» маркерами ПОУГ, при всех стадиях, являются аллель *A* и генотип *GA*.

5. Разработана прогностическая панель маркеров в генах эндогенных медиаторов врожденного иммунитета (*NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB*), ассоциированных с развитием или с отсутствием риска развития первичной открытоугольной глаукомы, в том числе в зависимости от тяжести заболевания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выявления риска развития ПОУГ рекомендуется проводить оценку генетических маркеров (*NLRP3*, *CASP1*, *eNOS*, *EDNRB*).

2. Важными прогностическими маркерами тяжелого течения заболевания являются определение аллеля *T* и гетерозиготного генотипа *TC* (полиморфного маркера *rs7525979* гена *NLRP3*), генотипа *GG* (полиморфного маркера *rs5351* гена *EDNRB*).

3. Дополнительными предикторами развития ПОУГ является определение гаплотипа *TTTTTT* и генотипа *TT* (полиморфного маркера *T786C – rs2070744*) гена *eNOS*, ассоциированных с развитием начальных стадий заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кинкулькина, А.Р.** Ассоциация полиморфизма гена *eNOS* с риском развития открытоугольной глаукомы / **А.Р. Кинкулькина, А.С. Авагян** // Санкт-Петербургские научные чтения-2019. Тезисы VIII международного молодежного медицинского конгресса. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 216-217.

2. Association of the *eNOS* gene polymorphism with the risk of open-angle glaucoma development / О.А. Svitich, Т. Gavrilova, **А. Kinkulkina** [et al.] // Allergy. – 2020. – Vol. 75, № S109. – P. 342.

3. Ассоциация полиморфизма гена *eNOS* с риском развития первичной открытоугольной глаукомы / О.А. Свитич, Т.В. Гаврилова, **А.Р. Кинкулькина, А.С. Авагян** // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета. – Москва, 2020. – С. 18.

4. Ассоциация полиморфизма гена *NLRP3* с риском развития первичной открытоугольной глаукомы / О.А. Свитич, Т.В. Гаврилова, **А.Р. Кинкулькина, А.С. Авагян** // New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Epidemiology and Immunology. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН / Под ред. В.В. Зверева. – Москва, 2022. – С. 28.

5. Роль полиморфизма гена *eNOS* в иммунопатогенезе Первичной открытоугольной глаукомы / О.А. Свитич, **А.Р. Кинкулькина, А.С. Авагян, Т.В. Гаврилова** // **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2022. – Т. 99, № 1. – С. 54-62.

6. Авагян, А.С. Роль полиморфизма гена *eNOS* в развитии Первичной открытоугольной глаукомы / А.С. Авагян, **А.Р. Кинкулькина, О.А. Свитич** // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, № S2. – С. 108. [Scopus]

7. Ассоциация полиморфных маркеров в гене *eNOS* с риском развития Первичной открытоугольной глаукомы у жителей пермского края / Т.В. Гаврилова, **А.Р. Кинкулькина, А.С. Авагян, О.А. Свитич** // **Российский иммунологический журнал.** – 2022. – Т. 25, № 1. – С. 83-92.

8. Роль *NLRP3* в иммунопатогенезе нейродегенеративных заболеваний глаз / Н.В. Балацкая, Т.В. Гаврилова, **А.Р. Кинкулькина** [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 485-490.

9. Investigation of local expression of *NLRP3* inflammasome complex genes in modeling retinal degeneration in vivo / N.V. Neroeva, O.A. Svitich, V.V. Neroev, **A.R. Kinkulkina** [et al.] // Medical Immunology (Russia). – 2023. – Vol. 25, № 3. – P. 631-636.

10. Исследование ассоциации аллелей и генотипов полиморфного маркера T786c гена *eNOS* при различных стадиях Первичной открытоугольной глаукомы / Т.В. Гаврилова, **А.Р. Кинкулькина**, А.С. Авагян, О.А. Свитич // **Российский офтальмологический журнал**. – 2024. – Т. 17, № 1. – С. 28-31. [Scopus]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НПГ – нейродегенеративная патология глаз	PRR – pattern recognition receptor
ЗН – зрительный нерв	<i>eNOS</i> – эндотелиальная синтаза оксида азота
ВГД – внутриглазное давление	TLR – Toll-like receptors
ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома	HSP – Heat shock proteins
ТК сетчатки/РПЭ – тканевой комплекс сетчатки и ретинальный пигментный эпителий	HMGB1 – high-mobility group protein B1
NO – оксид азота	NF-κB – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ДЗН – диск зрительного нерва	ОШ – отношение шансов
DAMP – damage-associated molecular patterns	ДИ – 95% доверительный потенциал