

ОБЗОР

©Коллектив авторов

ПОИСК ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ УТОЧНЯЮЩЕЙ ДИАГНОСТИКИ КЕРАТОКОНУСА

Л.О. Скородумова^{1*}, А.В. Белодедова², Е.И. Шарова¹, Б.Э. Малюгин²

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; *эл. почта: l.skorodumova@rccpm.org

²Национальный медицинский исследовательский центр “Межотраслевой научно-технический комплекс
“Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Федорова”, 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а

Кератоконус – это хроническое заболевание роговицы, характеризующееся её прогрессирующим истончением, её растяжением и конусовидным выпячиванием. Диагностика субклинического кератоконуса, а также его ранних стадий (*forme fruste*) представляет собой сложную проблему. Наличие данных форм кератоконуса у пациента является одной из причин развития кератэктазий после лазерных рефракционных вмешательств. В настоящее время доказана роль генетических факторов в развитии кератоконуса. Это указывает на возможность разработки диагностики субклинической формы и *forme fruste* кератоконуса с помощью генетических маркеров. Знание о генетической предрасположенности к кератоконусу у пациента позволило бы скорректировать тактику лечения рефракционных аномалий и избежать тяжелых побочных эффектов. Исследования каузальных мутаций свидетельствуют о генетической гетерогенности кератоконуса, что затрудняет разработку диагностической панели. Одним из подходов к поиску диагностических маркеров может быть отбор кандидатных вариантов из известных на данный момент на основании четких критериев. В данном обзоре были проанализированы работы, посвященные изучению маркеров кератоконуса, которые позволяют сформировать список кандидатных вариантов для генотипирования в российской популяции. Критерии отбора учитывали комплексы симптомов, при которых обнаруживался маркер, популяции, в которых был исследован тот или иной маркер, а также наличие и результаты репликационных исследований. В анализ были включены маркеры в генах *VXS1*, *SOD1*, *ZEB1*, *LOX*, *CAST*, *DOCK9*, *TGFBI*, *HGF*, *MAP3K19*, *KCND3*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL5A1*, *FND3B*, *FOXO1*, *BANP-ZNF469*, *MPDZ-NF1B*, *WNT10A*. По результатам анализа отобраны следующие кандидатные варианты для генотипирования в российской популяции пациентов с кератоконусом: rs1536482 и rs7044529 в гене *COL5A1*, rs5745752 и rs2286194 в гене *HGF*, rs4954218 в гене *MAP3K19*, rs4839200 вблизи гена *KCND3*, rs2721051 вблизи гена *FOXO1*, rs1324183, расположенный между генами *MPDZ* и *NF1B*, и rs121908120 в гене *WNT10A*.

Ключевые слова: кератоконус; генетические маркеры; *VXS1*; *SOD1*; *ZEB1*; *LOX*

DOI: 10.18097/PBMC20196501009

ВВЕДЕНИЕ

Кератоконус – это заболевание роговицы, при котором происходит её истончение, растяжение и конусовидное выпячивание, а при далеко зашедшем процессе – помутнение и рубцевание, приводящее к значительному снижению остроты зрения. Кератоконус обычно имеет прогрессирующее течение, занимающее период 5-10 лет, а иногда до 20 лет [1, 2]. При этом проявления болезни зачастую начинаются в подростковом возрасте, то есть затрагивает экономически активную часть общества [3]. Манифестирующие стадии кератоконуса уверенно диагностируются с использованием кератопахиметрии и кератотопографии. Диагностика субклинического кератоконуса, а также ранних его стадий (*forme fruste*) представляет собой сложную проблему. Поиск диагностических критериев генетической предрасположенности к кератоконусу актуален в связи с тем, что он является одной из причин развития кератэктазий после лазерных рефракционных вмешательств [4-7]. По данным исследований, такие осложнения развиваются у 0,2% пациентов после лазерных рефракционных вмешательств [8]. В связи с этим ранняя дифференциальная диагностика отдельных

нозологических форм кератоконуса крайне важна для постановки диагноза и определения дальнейшей тактики лечения.

В настоящее время доказан вклад генетической обусловленности в развитие кератоконуса. Была выявлена конкордантность по кератоконусу между монозиготными и дизиготными близнецами, что подтверждает высокую степень наследуемости данного заболевания [9-13]. Существуют многочисленные свидетельства семейных случаев этой патологии органа зрения. Семейно-наследственный характер кератоконуса наблюдается от 10% до 32% случаев [14-17]. У родственников первого порядка частота встречаемости кератоконуса в 16-67 раз выше, чем в общей популяции [18]. В большинстве исследований был установлен аутосомно-доминантный тип наследования кератоконуса [19-21]. Однако сообщается и о случаях аутосомно-рецессивного типа наследования кератоконуса, часто в комбинации с другими заболеваниями/симптомами, например, амаврозом Лебера или комплексом симптомов: умственной отсталостью, фебрильными судорогами и синоатриальным блоком [22, 23]. Кератоконус встречается у женщин и мужчин приблизительно в равном соотношении [3, 24]; заболеваемость в среднем составляет 1 на 2000 человек [2, 24-26].

* - адресат для переписки

Многочисленные свидетельства генетической обусловленности кератоконуса сочетаются с результатами поиска каузальных мутаций, которые указывают на генетическую гетерогенность кератоконуса [27]. В данном обзоре будут проанализированы работы, посвященные изучению маркеров кератоконуса, с целью формирования списка кандидатных вариантов для генотипирования в российской популяции, который бы мог стать предпосылкой для разработки панели для уточняющей диагностики кератоконуса.

1. УСЛОВИЯ ОТБОРА КАНДИДАТОВ

1.1. Варианты при кератоконусе как индивидуальном состоянии

В связи с тем, что на данный момент стоит задача разработки уточняющей диагностики латентных и субклинических форм кератоконуса, то исключались варианты, которые были выявлены как каузальные только на выборках пациентов с комплексом заболеваний/симптомов, где кератоконус был одним из симптомов. Например, в список кандидатов не были включены варианты в гене микроРНК 184, считающиеся каузальными при тяжёлом кератоконусе, комбинированном с переднеполярной катарактой раннего начала [28]. Также не были включены мутации, обнаруженные при кератоконусе, комбинированном с амаврозом Лебера, X-сцепленной ангиродитической эктодермальной дисплазией [29, 30].

1.2. Выбор популяции европейского происхождения

В связи с популяционной специфичностью маркеров кератоконуса были отобраны варианты, заявленные как кандидатные в исследованиях, выполненных на популяциях из Европы, Северной Америки и Австралии (так называемые популяции европейского происхождения; European descent) [31]. При этом выяснено, что среди азиатских популяций, в том числе Индии, Пакистана, Китая, стран Среднего Востока, кератоконус встречается чаще, чем в Европе и США [32-36]. Наблюдаемые закономерности могут быть обусловлены разной распространенностью каузальных аллелей в тех или иных популяциях. Поскольку 80,9% населения Российской Федерации составляют русские, также относящиеся к популяциям европейского происхождения, то можно предположить, что частота встречаемости тех или иных кандидатных вариантов в российской популяции будет наиболее близка частотам в вышеуказанных популяциях [37, 38].

1.3. Точные координаты варианта

Ещё одним важным условием было знание точных координат варианта. В данном анализе не были рассмотрены исследования генетических причин кератоконуса, выполненные с помощью анализа сцепления генов в семейных случаях кератоконуса, если в результате их и дальнейших работ не были установлены конкретные координаты варианта. Таким образом, основными источниками кандидатных вариантов являлись полногеномные

исследования ассоциаций (genome-wide association study – GWAS) и исследования по генотипированию отдельных вариантов.

1.4. Ассоциация вариантов, подтверждённая на независимой выборке

Если вариант был обнаружен в ходе GWAS, то для включения в список кандидатных маркеров было необходимо наличие исследования, подтверждающего ассоциацию данного варианта на независимой выборке в ходе генотипирования отдельных вариантов. В связи с высокой генетической гетерогенностью кератоконуса для включения в список кандидатов было достаточно хотя бы одного исследования, в котором ассоциация варианта подтверждалась.

1.5. Направленность ассоциации

Отбирались варианты, для которых в GWAS и исследованиях по генотипированию отдельных вариантов совпадали направления ассоциации (прямая или обратная).

1.6. Специфичность

Отбирались варианты, имеющие специфичность не ниже средней ($>0,6$). В связи с тем, что кератоконус является гетерогенным заболеванием, специфичность маркера имеет приоритетное значение.

2. МАРКЕРЫ, НЕ ВКЛЮЧЁННЫЕ В СПИСОК КАНДИДАТНЫХ ВАРИАНТОВ

Ниже будут представлены гены, для которых была исследована ассоциация с кератоконусом, но ни один из обнаруженных в них маркеров не удовлетворяет условиям отбора кандидатных вариантов.

2.1. Маркеры в гене *VSX1*

Ген *VSX1* (visual system homeobox 1) кодирует транскрипционный фактор, контролирующий развитие черепно-лицевого отдела и глаза. В связи с этим была изучена его связь с различными дистрофиями роговицы (табл. 1) [39]. Экспрессия *VSX1* в зрелых тканях ограничена сетчаткой и роговицей [40]. Исследование Неон и соавт. впервые показало наличие мутаций в *VSX1* при кератоконусе [39]. В выборке пациентов были обнаружены замены с.475T>A и с.496C>T. В ходе репликационных исследований участки гена *VSX1*, в которых были обнаружены мутации, неоднократно генотипировались на независимых выборках пациентов с кератоконусом из Европы и США [41-47]. Ни в одном из исследований не было обнаружено замены с.496C>T. Другие замены обнаруживались в отдельных семьях: с.50T>C и с.432C>G – в двух семьях каждый, с.475T>A, с.479G>A, и с.740C>G – в одной семье каждый, и в единичных спорадических случаях (с.479G>A и с.432C>G). Согласно полученным результатам, мутации в гене *VSX1* имеют ограниченное значение в развитии кератоконуса [41-49]. В связи этим они не были включены в список кандидатных вариантов.

Таблица 1. Данные о функциях белков, кодируемых генами, ассоциированными с кератоконусом

Название гена	Название кодируемого белка	Функция белка	Заболевания, вызываемые мутациями в данном гене	Ссылка
<i>VSX1</i>	Visual system homeobox 1	Транскрипционный фактор, контролирующий развитие черепно-лицевого отдела и глаза	Задняя полиморфная дистрофия роговицы	[39]
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1	Фермент, разрушающий супероксидный анион	Боковой амиотрофический склероз	[50]
<i>ZEB1</i>	Zinc finger E-box binding homeobox 1	Транскрипционный фактор, важен в эмбриональном развитии. Репрессор E-кадгерина	Задняя полиморфная дистрофия роговицы 3-го типа, первичная эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса	[55, 56]
<i>TGFBI</i>	TGFβ-induced protein	Внеклеточный белок, который обеспечивает связь клеток с коллагеновыми фибриллами	Гранулярная и решетчатая дистрофия роговицы	[64-66]
<i>DOCK9</i>	Dedicator of cytokinesis 9	Участвует в активации Rho GTPазы Cdc42, регулирующей актиновый цитоскелет, миграцию, рост и выживание клеток	—	[74]
<i>LOX</i>	Lysyl oxidase	Участвует в сшивании коллагена и эластина путем каталитического окислительного дезаминирования эпсилон-аминогруппы некоторых остатков лизина и гидроксизина	Предрасположенность к аневризме и расслоению грудной части аорты	[76, 77]
<i>CAST</i>	Calpastatin	Ингибитор кальпаинов, нелизосомальных внутриклеточных протеаз	Шелушение кожи с лейконихией, точечными кератомами акральных областей, хейлитом и узловатостью фаланг пальцев	[84, 85]
<i>COL4A3</i>	Collagen type IV alpha 3 chain	Структурный белок, главный структурный компонент базальных мембран	Аутосомно-рецессивный синдром Альпорта II типа, доброкачественная семейная гематурия, задняя полиморфная дистрофия роговицы типа 3	[88, 89]
<i>COL4A4</i>	Collagen type IV alpha 4 chain	Структурный белок, структурный компонент некоторых базальных мембран	Аутосомно-рецессивный синдром Альпорта II типа, доброкачественная семейная гематурия	[88,89]
<i>COL5A1</i>	Collagen type V alpha 1 chain	Структурный белок, встраивается в фибриллы, состоящие из коллагена I, II и III типа, регулируя их толщину	Синдром Элерса-Данлоса I и II типа	[94-97]
<i>HGF</i>	Hepatocyte growth factor	Регулирует рост, подвижность и морфогенез многих типов клеток и тканей.	Несиндромальная потеря слуха	[101, 102]
<i>MAP3K19</i>	Mitogen activated protein kinase 19	Киназа из семейства митоген-активируемых протеинкиназ, которая участвует в активации сигнального пути TGFβ в легких при идиопатическом легочном фиброзе	—	[110]
<i>FNDC3B</i>	Fibronectin type III domain containing 3B	Активация эпителиально-мезенхимального перехода, TGFβ, Rb1 и Akt/PI3K сигнальных путей	Пороки развития черепно-лицевого отдела	[112, 113]
<i>WNT10A</i>	Wnt family member 10A	Лиганд канонического Wnt сигнального пути, играющего критическое значение в эмбриональном развитии	Ангидротическая эктодермальная дисплазия, одонто-онихо-дермальная дисплазия, синдром Шоп-Шульца-Пассаржа (кисты век, пальмоплантарная кератодермия, гиподонтия и гипотрихоз), агенез зубов	[115-117]

2.2. Маркеры в гене *SOD1*

Роговица подвержена окислительному стрессу в связи с постоянным ультрафиолетовым облучением. Одним из основных факторов, защищающим глаз от окислительного повреждения, является супероксиддисмутаза 1 (*SOD1*) (табл. 1). Данный фермент нейтрализует супероксидный анион и кодируется геном *SOD1*. Мутации в гене *SOD1* связаны с развитием бокового амиотрофического склероза [50]. Снижение активности системы антиоксидантной защиты в условиях окислительного стресса может служить причиной гибели кератиноцитов, наблюдаемой при кератоконусе [51]. В роговице пациентов с кератоконусом снижается общее количество *SOD1* по сравнению с уровнями в роговице здоровых доноров [52]. В двух работах была обнаружена повышенная частота встречаемости интронной делеции с.169+50delTAAACAG в выборке пациентов с кератоконусом [47, 53]. Однако, данная закономерность не воспроизвелась на итальянской, словенской и русской выборках [45, 54, 55]. Исходя из вышеизложенных результатов, обнаруженная делеция в гене *SOD1*, по-видимому, не связана с развитием кератоконуса, и не была включена в список кандидатных маркеров.

2.3. Маркеры в гене *ZEB1*

Ген *ZEB1* (zinc finger E-box binding homeobox 1) кодирует транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в эмбриональном развитии (табл. 1). Мутации в гене *ZEB1* являются каузальными для задней полиморфной дистрофии роговицы типа 3 (Posterior polymorphous corneal dystrophy type 3 – PPCD3), в редких случаях – для дистрофии роговицы Фукса (Fuchs endothelial corneal dystrophy – FECD) [56]. *ZEB1* участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе, являясь репрессором E-кадгерина [57]. Было показано, что *ZEB1* связывается с промотором гена *COL4A3* [58]. Также сообщалось, что увеличение синтеза *ZEB1* при FECD приводит к увеличению количества коллагена IV [59]. Таким образом, можно предположить, что мутации в гене *ZEB1* приводят к снижению синтеза соответствующего белка и, следовательно, к снижению синтеза коллагена IV, которое наблюдается при кератоконусе [60]. В большинстве исследований мутации в гене *ZEB1* встречались у пациентов, у которых сочетались кератоконус и PPCD3 или кератоконус и FECD [61-63]. В выборке пациентов с изолированным кератоконусом из Великобритании и Канады также были детектированы мутации в *ZEB1* [61]. Они обуславливали четыре синонимичные замены D64D, A419A, P1059P и P891P, а также три несинонимичные замены N78T, G525E и Q640H. Ассоциация вариантов, обнаруженных в данном исследовании, пока не подтверждена на других выборках. Также не проведены функциональные исследования патогенности обнаруженных вариантов. В связи с этим, мутации в гене *ZEB1* не были включены в список кандидатных вариантов.

2.4. Маркеры в гене *TGFBI*

Белок, индуцированный трансформирующим фактором роста бета (TGFβ-induced protein – TGFBIp), является внеклеточным белком, который обеспечивает связь клеток с коллагеновыми фибриллами (табл. 1). Со стороны клетки TGFBIp связывается с интегринами, а со стороны внеклеточного пространства – с коллагеном XII, который прикреплен к коллагеновым фибриллам [64]. Несинонимичные замены в *TGFBI* ассоциированы с развитием гранулярной и решётчатой дистрофий роговицы. При данных видах дистрофий мутированный белок TGFBIp образует агрегаты, и вследствие их накопления в роговице происходит потеря её прозрачности [65, 66]. В выборке пациентов с кератоконусом из Китая у одного пациента была обнаружена нонсенс мутация с.1603G>T, которая отсутствовала в контрольной выборке [67]. Учитывая роль TGFBIp в адгезии клеток к коллагену, и то, что при кератоконусе наблюдается нарушение снижения числа и структуры коллагеновых пластинок, нельзя исключить патогенность обнаруженной мутации [68]. Мутация с.1603G>T не была выявлена в польской и американской выборках [69, 70]. В данных выборках были обнаружены другие варианты, но значимой ассоциации с кератоконусом выявлено не было. Таким образом, несмотря на возможное наличие каузальной роли в развитии кератоконуса, мутация с.1603G>T в гене *TGFBI*, скорее всего, не ассоциируется с кератоконусом в европеоидных популяциях. На основании вышеизложенного, мутация с.1603G>T в гене *TGFBI* не была включена в список кандидатных вариантов.

2.5. Маркер в гене *DOCK9*

В исследовании Gajeska и соавт. с помощью полногеномного анализа однонуклеотидных полиморфизмов в 18 семьях из Эквадора был выявлен регион 13q32 [71]. С помощью секвенирования кандидатных генов, расположенных в данном регионе, была идентифицирована мутация с.2262A>C в гене *DOCK9* (dedicator of cytokinesis 9), сегрегирующаяся в семьях [72]. Обнаруженная связь не была подтверждена при исследовании в чешской популяции пациентов с кератоконусом [69]. Мутация с.2262A>C приводит к проскакиванию экзона при сплайсинге пре-мРНК гена *DOCK9* и образованию стоп-кодона и преждевременной терминеции трансляции [73]. Однако, неизвестно, влияет ли наличие данной мутации в гетерозиготном состоянии на уровень полноразмерного белка. *DOCK9* участвует в активации Rho GTPазы Cdc42, регулирующей актиновый цитоскелет, миграцию, рост и выживание клеток (табл. 1) [74]. Снижение количества полноразмерного белка может привести к ухудшению перечисленных функций. Для выяснения патогенетических механизмов мутации с.2262A>C необходимы дополнительные исследования. Суммируя вышесказанное, варианты в *DOCK9*, вероятно, имеют значение как маркеры кератоконуса только в отдельных семейных случаях в Эквадоре, поэтому не были включены в список кандидатных вариантов.

2.6. Маркеры в гене *LOX*

В ходе анализа сцепления 110 сиб-пар с кератоконусом был обнаружен регион связи на длинном плече 5 хромосомы [75]. Один из кандидатных генов, расположенных в данном регионе, – ген лизилоксидазы *LOX* (lysyl oxidase). Лизилоксидаза участвует в сшивании коллагена и эластина путем каталитического окислительного дезаминирования эпсилон-аминогруппы некоторых остатков лизина и гидроксизина (табл. 1) [76]. Мутации в гене *LOX* вызывают развитие аневризм и расслоения грудной части аорты [77]. Патогенное действие мутаций в данном гене может быть обусловлено нарушением функции белка и уменьшением числа коллагеновых связей в стромах роговицы, что, в свою очередь, может ухудшить биомеханические свойства роговицы и способствовать развитию кератоконуса. Это подтверждается снижением экспрессии гена *LOX* в эпителии роговицы пациентов с кератоконусом; кроме того, оно коррелирует со стадией заболевания [78, 79]. Проведенное тестирование ассоциации вариантов в гене *LOX* с кератоконусом в независимых выборках семейных и спорадических случаев кератоконуса выявило, что однонуклеотидные полиморфизмы (single-nucleotide polymorphisms – SNP) rs10519694 и rs2956540 в гене *LOX* ассоциируются с кератоконусом. Эта ассоциация подтвердилась и на выборке семейных случаев кератоконуса и мета-анализе ($OR=0,72$, $p=4E-05$; $OR=0,69$, $p=2,5E-07$, соответственно) (табл. 2) [80]. Ассоциация вариантов rs10519694 и rs2956540 с кератоконусом воспроизвелась при обзоре комбинированных данных европейцев и китайцев (когорт ($OR=0,77$, $p=0,026$; $OR=0,71$, $p=1,43E-08$, соответственно) [81]. При генотипировании выборочных SNP в чешской выборке подтвердилась только ассоциация rs2956540 с кератоконусом ($OR=0,69$; $p=0,024$) (табл. 2) [82]. Однако, данный SNP имеет невысокие значения чувствительности (0,32-0,37) и специфичности (0,56-0,60), в связи с чем является плохим классификатором ($AUC=0,46$). В двух исследованиях была изучена ассоциация rs1800449 с кератоконусом; в одном случае она была значимой ($OR=0,74$; $p=0,02$), а в другом – нет ($OR=0,72$; $p=0,12$) (табл. 2) [80, 82]. Таким образом, ни один SNP, расположенный в гене *LOX*, не был включён в список кандидатных маркеров, ассоциирующихся с кератоконусом.

2.7. Маркеры в гене *CAST*

В нескольких исследованиях локусы сцепления детектировались на длинном плече 5 хромосомы: в работе Li и соавт., включавшей 67 семейств европейского и латиноамериканского происхождения (110 сиб-пар), 5q14.3–q21.1 в европеоидной семье с аутосомно-доминантным типом наследования, 5q21.2 в работе Bisceglia и соавт., включавшей 25 семей из южной Италии [16, 75, 83]. В этом регионе расположен ген *CAST*, который кодирует кальпастатин (calpastatin), ингибитор кальпаинов, нелизосомальных внутриклеточных протеаз (табл. 1) [84]. Мутации в данном гене вызывают развитие комплекса

симптомов, включающих шелушение кожи с лейкоихией, точечными кератомами акральных областей, хейлитом и узловатостью фаланг пальцев [85]. Одной из мишеней кальпаинов является кератин. *CAST* активно экспрессируется в глазу; профиль его транскрипт-вариантов меняется при развитии кератоконуса [86, 87]. На выборке семейных случаев кератоконуса и независимой выборке спорадических случаев кератоконуса было проведено генотипирование ряда SNP в гене *CAST*. В обеих выборках и мета-анализе значимой была ассоциация rs4434401 ($OR=1,92$, $p=0,005$ в семейной выборке; $OR=1,23$, $p=0,05$ в выборке спорадических случаев; и $OR=1,32$, $p=0,002$ в мета-анализе) с кератоконусом (табл. 2) [87]. Однако rs4434401 не удовлетворяет условиям отбора кандидатных маркеров в связи с тем, что его специфичность равна 0,6. На основании полученных результатов, SNP rs4434401 в гене *CAST* не был включён в список кандидатных вариантов, ассоциирующихся с кератоконусом.

3. МАРКЕРЫ, ВКЛЮЧЁННЫЕ В СПИСОК КАНДИДАТНЫХ ВАРИАНТОВ

3.1. Маркеры в генах коллагенов

Патогенез кератоконуса сопровождается истончением стромы роговицы и ослаблением её биомеханических свойств. Это, в частности, связано с уменьшением количества ключевых белков стромы – коллагенов типов COL4A3 (collagen type IV alpha 3 chain) и COL4A4 (collagen type IV alpha 4 chain) (табл. 1) [60]. Показана связь между мутациями в генах *COL4A4* и *COL4A3* и развитием синдрома Альпорта II типа и доброкачественной семейной гематурии [88, 89]. Кроме того, было показано, что мутации в гене *COL4A3* вносят вклад в развитие PPCD3 [56]. Все эти данные послужили причиной целенаправленного генотипирования вариантов в генах *COL4A3* и *COL4A4* [90]. На выборке пациентов из Словении была обнаружена достоверная разница в частоте аллелей у пациентов с кератоконусом и контрольной выборки для rs55703767 в гене *COL4A3* ($OR=0,06$, $p<0,0001$), но она не подтвердилась на выборке пациентов с кератоконусом из Греции (табл. 2) [91].

В гене *COL4A4* были изучены маркеры rs2229813 и rs2228557 [90, 91]. Распределение генотипов для rs2229813 в выборках из Словении и Греции было сходным, однако авторы сделали разные выводы (табл. 2). В словенской выборке авторы обнаружили ассоциацию rs2229813 в доминантной модели с условием, что “G” является маркерной аллелью ($OR=12,92$, $p<0,0001$) [90]. Kokolakis и соавт. заключили, что rs2229813 не имеет связи с кератоконусом в выборке пациентов из Греции, однако отметили повышенную представленность генотипа “AA” в контрольной группе [91]. Хотя при пересчёте генотипов в греческой выборке с условием, что аллель “G” – маркерная, нами были получены значения, аналогичные таковым для словенской выборки ($OR=4,51$, $p=0,015$).

ПОИСК МАРКЕРОВ ДЛЯ УТОЧНЯЮЩЕЙ ДИАГНОСТИКИ КЕРАТОКОНУСА

Таблица 2. Диагностические показатели отдельных маркеров кератоконауса

Ген	Идентификационный номер маркера согласно dbSNP	Положение в гене, в случае расположения в экзоне - изменение на уровне последовательности белка	Метод исследования, в котором был изучен маркер	Характеристика выборки	OR	P value	SE	SP	AUC	Ссылка	Включение в список кандидатных вариантов
LOX	rs10519694	интрон	GWAS	семейные и спорадические	0,72	4,00E-05	0,19	0,74	0,47	[80]b	не включен
	rs2956540	интрон	выборочные SNP	спорадические	0,82	0,32	0,20	0,77	0,48	[82]	не включен
	rs2288393	5'UTR	GWAS	семейные и спорадические	0,69	2,50E-07	0,37	0,56	0,46	[80]b	не включен
	rs1800449		выборочные SNP	спорадические	0,69	0,024	0,32	0,60	0,46	[82]	не включен
			выборочные SNP	спорадические	0,67	0,087	0,12	0,83	0,48	[82]	не включен
CAST		R158E	выборочные SNP	семейные и спорадические	0,74	0,02	0,16	0,79	0,48	[80]	не включен
	rs4434401	интрон	выборочные SNP	спорадические	0,72	0,12	0,13	0,82	0,48	[82]	не включен
			выборочные SNP	семейные	1,92	0,005	0,52	0,60	0,56	[87]	не включен
COL4A3	rs55703767	D326Y	выборочные SNP	спорадические	1,23	0,05	0,53	0,52	0,52	[87]	не включен
			выборочные SNP	спорадические	0,06	<0,0001	0,08	0,42	0,25	[90]a	не включен
			выборочные SNP	спорадические	1,21	0,61	0,44	0,61	0,52	[91]a	не включен
COL4A4	rs2229813	V1327M	выборочные SNP	спорадические	12,92	<0,0001	0,95	0,39	0,67	[90]a	не включен
	rs2228557	F1644=	выборочные SNP	спорадические	4,51	0,015	0,93	0,24	0,59	[91]a	не включен
	rs2228555	V1516=	выборочные SNP	спорадические	0,59	0,047	0,59	0,29	0,44	[90]a	не включен
			выборочные SNP	спорадические	0,41	0,023	0,47	0,32	0,39	[91]a	не включен
			выборочные SNP	спорадические	2,00	0,036	0,84	0,28	0,56	[90]a	не включен
COL5A1	rs1536482	межгенное пространство	GWAS	спорадические	1,32	6,50E-03	0,41	0,67	0,54	[98]	включен
			выборочные SNP	семейные и спорадические	1,28	0,02	0,42	0,62	0,52	[98]c	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,32	1,20E-05	0,40	0,66	0,53	[99]d	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,15	0,387	0,33	0,71	0,52	[100]	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,34	0,066	0,36	0,71	0,53	[101]	включен
HGF	rs7044529	интрон	GWAS	спорадические	1,44	7,40E-03	0,17	0,86	0,515	[98]	включен
			выборочные SNP	семейные и спорадические	1,96	0,03	0,22	0,88	0,55	[98]c	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,34	3,00E-04	0,18	0,86	0,52	[99]d	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,11	0,596	0,17	0,84	0,51	[100]	включен
			GWAS	семейные и спорадические	1,22	9,90E-07	0,44	0,50	0,47	[107]b	не включен
MAP3K19	rs3735520	межгенное пространство	выборочные SNP	спорадические	1,45	0,018	0,46	0,63	0,55	[82]	не включен
	rs17501108	межгенное пространство	GWAS	семейные и спорадические	1,87	9,90E-05	0,13	0,93	0,53	[107]b	не включен
	rs745752	интрон	выборочные SNP	спорадические	1,03	0,92	0,15	0,86	0,50	[82]	включен
	rs2286194	интрон	выборочные SNP	спорадические	1,58	0,0081	0,41	0,71	0,56	[108]	включен
			выборочные SNP	спорадические	0,52	0,0011	0,13	0,79	0,46	[108]	включен
KCNQ3	rs4954218	интрон	выборочные SNP	спорадические	0,69	0,004	0,17	0,77	0,47	[109]	включен
			выборочные SNP	семейные	0,68	0,009	0,17	0,77	0,47	[109]	включен
			выборочные SNP	спорадические	0,76	3,50E-04	0,25	0,69	0,47	[111]	включен
			GWAS	спорадические	1,53	0,047	0,18	0,87	0,53	[101]	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,79	1,10E-06	0,22	0,87	0,55	[109]	включен
FND3B	rs4894535	интрон	выборочные SNP	спорадические	1,44	1,40E-04	0,17	0,88	0,52	[111]	включен
			выборочные SNP	спорадические	0,94	0,82	0,13	0,87	0,50	[101]	не включен
			выборочные SNP	спорадические	1,47	4,90E-09	0,21	0,85	0,53	[99]d	не включен
			выборочные SNP	спорадические	1,03	0,92	0,17	0,83	0,50	[101]	не включен
			GWAS	спорадические	1,62	2,70E-10	0,15	0,90	0,52	[99]d	включен
FOXO1	rs2721051	интрон	выборочные SNP	спорадические	1,45	0,057	0,15	0,90	0,53	[100]	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,72	0,025	0,14	0,91	0,53	[101]	включен
			GWAS	спорадические	1,25	1,90E-04	0,59	0,56	0,58	[99]d	не включен
	rs9938149	межгенное пространство	выборочные SNP	спорадические	1,47	0,01	0,72	0,38	0,55	[100]	не включен
			выборочные SNP	спорадические	0,83	0,27	0,34	0,62	0,48	[101]	не включен
MPDZ - NF1B	rs1324183	межгенное пространство	GWAS	спорадические	1,33	5,20E-06	0,25	0,79	0,52	[99]d	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,68	0,001	0,29	0,82	0,56	[100]	включен
			выборочные SNP	спорадические	1,58	0,01	0,28	0,80	0,54	[101]	включен

Примечание: а – приведены расчёты для доминантной модели; b – приведены расчёты для репликативной группы; с – приведены расчёты для мета-анализа групп; d – приведены расчёты по мета-анализу групп случай-контроль.

В словенской и греческой выборках была обнаружена обратная зависимость rs2228557 и кератоконуса для доминантной модели, при условии, что "Т" является маркерной аллелью, (OR=0,59, p=0,047; OR=0,41, p=0,023, соответственно). Необходимо учесть, что маркеры rs2229813 и rs2228557 имеют низкие значения специфичности (<0,4), в связи с чем они не были включены в список кандидатных маркеров.

Исследование ассоциации кератоконуса с генами *COL4A1*, *COL4A2*, *COL8A1*, *COL8A2* не выявило достоверной связи данных генов с кератоконусом [92, 93]. Ген *COL5A1* кодирует альфа 1 цепь коллагена V типа (collagen type V alpha 1 chain). Коллаген V типа встраивается в фибриллы, состоящие из коллагена I, II и III типа, и регулирует их толщину (табл. 1) [94]. Коллаген V типа составляет 10-20% от всего коллагена в роговице [95]. Мутации в гене *COL5A1* приводят к развитию синдрома Элерса-Данлоса [96, 97]. У пациентов с данным заболеванием отмечалось уменьшение толщины роговицы и снижение плотности коллагеновых фибрилл [95]. Сходные изменения наблюдаются при кератоконусе [67]. Всё это свидетельствует в пользу ассоциации маркеров в гене *COL5A1* с кератоконусом. В результате GWAS с европеоидной выборкой пациентов с кератоконусом были обнаружены SNP rs7044529 в гене *COL5A1* и rs1536482 рядом с данным геном, ассоциирующиеся с центральной толщиной роговицы (central corneal thickness – CCT) (табл. 2) [98]. Ассоциация rs1536482 и rs7044529 с кератоконусом была подтверждена в репликационной когорте пациентов (OR=1,28, p=0,02 и OR=1,96, p=0,03, соответственно). Связь данных SNP с CCT воспроизвелась также в другом GWAS, и была валидирована на европеоидной выборке из Австралии и Северной Ирландии (rs1536482: OR=1,32, p=1,2E-05; rs7044529: OR=1,34, p=3,0E-04) (табл. 2) [99]. Ассоциация rs1536482 и rs7044529 с кератоконусом не воспроизвелась на выборках пациентов из Австралии [100]. Ассоциация rs1536482 также не подтвердилась на выборке из Чехии [101].

На основании того, что ассоциация rs7044529 в гене *COL5A1* и rs1536482 вблизи *COL5A1* подтвердилась в одном репликационном исследовании, они были включены в список кандидатных маркеров.

3.2. Маркеры в гене *HGF*

Ген *HGF* кодирует фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor), который регулирует рост, подвижность и морфогенез многих типов клеток и тканей (табл. 1) [102]. Мутации в данном гене ассоциированы с несиндромальной потерей слуха [103]. *HGF* участвует в восстановлении роговицы после повреждения, подавляя сигнальный путь TGFβ [104, 105]. Снижение активности *HGF* приводит к персистенции миофибробластов в области повреждения и фиброзу роговицы. Учитывая, что в роговице пациентов с кератоконусом также была обнаружена активация TGFβ, существует вероятность, что мутации в гене *HGF* могут быть каузальными [106]. GWAS с участием когорты

пациентов с кератоконусом из Австралии привёл к идентификации SNP rs3735520 (OR=1,22, p=9,9E-07 (данные мета-анализа всех выборок)) и rs17501108 (OR=1,87, p=9,9E-05) вблизи гена *HGF* (табл. 2) [107]. Однако связь rs3735520 и rs17501108 с кератоконусом не была подтверждена в чешской популяции пациентов с учетом доминантной модели [82]. Ещё два SNP в интроне гена *HGF* ассоциировались с кератоконусом в исследовании Sahebjada и соавт.: rs5745752 (OR=1,58, p=0,0081) и rs2286194 (OR=0,52, p=0,0011) (табл. 2) [108]. Для валидации ассоциации полиморфизмов rs5745752 и rs2286194 с кератоконусом необходимы дальнейшие исследования, тем не менее, с учётом их высокой специфичности (0,71 и 0,79, соответственно) они были включены в список кандидатных вариантов.

3.3. Маркеры в генах *MAP3K19* и *KCND3*

GWAS с участием европеоидных пациентов выявил однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с кератоконусом, в том числе rs4954218, расположенный в интроне гена *MAP3K19*, рядом с геном *RAB3GAP1* (OR=0,69, p=0,004 в репликационной выборке; OR=0,68, p=0,009 в семейной выборке), а также rs4839200 вблизи гена *KCND3* (OR=1,79, p=1,1E-06 в GWAS) (табл. 2) [109]. Ген *MAP3K19* кодирует киназу из семейства митоген-активируемых протеинкиназ (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19), которая участвует в активации сигнального пути TGFβ в лёгких при идиопатическом лёгочном фиброзе (табл. 1) [110].

Репликационные исследования ассоциации rs4954218 в гене *MAP3K19*, а также rs4839200 в гене *KCND3* были проведены в австралийской и чешской выборках пациентов с кератоконусом (табл. 2) [101, 111]. Связь rs4954218 с кератоконусом была подтверждена в обеих выборках; однако, в чешской выборке направление ассоциации было противоположным GWAS (OR=1,53, p=0,047). Ассоциация маркера в гене *KCND3* подтвердилась только в австралийской выборке (OR=1,4, p=1,4E-04). На основании этих результатов и с учётом значений специфичности rs4839200 и rs4954218 были включены в список кандидатных вариантов.

3.4. Маркеры в генах *FNDC3B*, *FOXO1*, *MPDZ-NF1B* и *BANP-ZNF469*, ассоциированные с центральной толщиной роговицы

В ходе мета-анализа работ, исследовавших связь кератоконуса с CCT, были обнаружены ассоциации с несколькими SNP (табл. 2) [99]. Среди них rs4894535 – замена в интроне гена *FNDC3B* (OR=1,47, p=4,9E-09). Ген *FNDC3B* кодирует белок, содержащий домены фибронектина типа III (fibronectin type III domain containing 3B) (табл. 1). При разных типах опухолей наблюдается амплификация локуса хромосомы, в котором расположен ген *FNDC3B* (3q26) [112]. Это приводит к усилению его экспрессии и активации эпителиально-мезенхимального перехода, TGFβ, Rb1 и Akt/PI3K сигнальных путей. Делеция локуса,

включавшего ген *FNDC3B*, приводила к порокам развития черепно-лицевого отдела [113]. Ассоциация rs4894535 в гене *FNDC3B* с кератоконусом не подтвердилась в репликационном исследовании на выборке из Чехии (табл. 2) [101].

Другие варианты, ассоциированные с ССТ в выборке пациентов с кератоконусом, включали замену rs2721051 вблизи гена *FOXO1* (forkhead box O1); rs9938149, расположенный между генами *BANP* (BTG3 associated nuclear protein) и *ZNF469* (zinc finger protein 469); а также rs1324183 между генами *MPDZ* (multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex component) и *NF1B* (nuclear factor 1 B) (табл. 2) [99]. Маркеры rs2721051, rs9938149 и rs1324183 расположены в межгенном пространстве, в связи с этим их каузальная связь с кератоконусом может не быть связанной с расположенными рядом генами и требует дальнейших исследований. Ассоциация данных SNP с кератоконусом была исследована на независимых выборках пациентов из Австралии и Чехии (табл. 2) [100, 101]. Связь rs2721051 (*FOXO1*) подтвердилась только на чешской выборке (OR=1,72, p=0,025), а rs9938149 (*BANP-ZNF469*) – только на австралийской выборке (OR=1,47, p=0,01). Однако, направление ассоциации rs9938149 с кератоконусом в австралийской выборке было противоположно результату, полученному в GWAS. В связи с тем, что rs9938149 имеет показатель специфичности <0,6, он не был включён в список кандидатных вариантов. Ассоциация с кератоконусом rs1324183 (*MPDZ-NF1B*) подтвердилась на обеих выборках: OR=1,58 на чешской выборке, OR=1,86 на австралийской выборке. Маркеры rs2721051 и rs1324183 имеют высокую специфичность (≥0,8).

Суммируя вышеизложенное, SNP rs2721051 в гене *FOXO1* и rs1324183, находящийся между генами *MPDZ* и *NF1B*, были включены в список кандидатных вариантов.

3.5. Маркер в гене *WNT10A*

В результате анализа данных гибридизации на чипе в когорте молодых индивидуумов из Австралии европейского происхождения была определена несинонимичная замена rs121908120 в гене *WNT10A* (p=6,63E-10) [114]. Ассоциация данного полиморфизма подтвердилась в независимых когортах пожилых индивидуумов из Нидерландов, группе близнецов из Австралии и группе австралийских пациентов с кератоконусом (OR=2,03, p=5,41E-05) [114]. Ген *WNT10A* (Wnt family member 10A) принадлежит к семейству генов WNT и активирует канонический WNT сигнальный путь (через активацию β-катенина), который имеет критическое значение для эмбрионального развития (табл. 1) [115]. Несинонимичные замены в гене *WNT10A* приводят к развитию одонто-онихо-дермальной дисплазии, характеризующейся гиперкератозом и гипергидрозом ладоней и подошв, гиподонтией, коническими зубами, ониходисплазией и редкими волосами [116]. Гомозиготная мутация rs121908120 детектирована у пациентов с агенезом зубов, гетерозиготные мутации приводили к мягкому или нормальному

фенотипу [117]. *WNT10A* экспрессируется в эпителии роговицы и лимбальных стволовых клетках [118]. Таким образом, rs121908120 в гене *WNT10A* является перспективным маркером кератоконуса и был включён в список кандидатных маркеров. Однако его ассоциация с данной патологией требует дальнейшей валидации в других популяциях и функциональных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам анализа молекулярно-генетических исследований, направленных на поиск маркеров кератоконуса, был сформирован список кандидатных вариантов для генотипирования в российской популяции пациентов с кератоконусом (табл. 2). Однако необходимо учитывать, что для всех перечисленных в итоговом списке вариантов на данный момент показана лишь ассоциативная связь с кератоконусом. Для выявления функциональной роли данных вариантов необходимы дальнейшие исследования. Поскольку все перечисленные варианты расположены в интронных или межгенных участках, то при наличии функциональной связи с развитием кератоконуса, в них могут располагаться энхансеры или транскрибируемые участки, кодирующие различные регуляторные РНК, и т.д.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Romero-Jiménez M., Santodomingo-Rubido J., Wolffsohn J.S. (2010) Contact Lens Anterior Eye, **33**(4), 157-166.
2. Rabinowitz Y.S. (1998) Survey Ophthalmol., **42** (4), 297-319.
3. Kennedy R.H., Bourne W.M., Dyer J. (1986) Am. J. Ophthalmol., **101** (3), 267-273.
4. Said A., Hamade I.H., Tabbara K.F. (2011) Saudi J. Ophthalmol., **25**(3), 225-230.
5. Randleman J.B., Woodward M., Lynn M.J., Stulting R.D. (2008) Ophthalmology, **115**(1), 37-50.
6. Dawson D.G., Randleman J.B., Grossniklaus H.E., O'Brien T.P., Dubovy S.R., Schmack I., Stulting R.D., Edelhauser H.F. (2008) Ophthalmology, **115**(12), 2181-2191. DOI: 10.1016/j.ophtha.2008.06.008.
7. Giri P., Azar D.T. (2017) Curr. Opin. Ophthalmol., **28**(4), 337-342.
8. Rad A.S., Jabbarvand M., Saifi N. (2004) J. Refract. Surg., **20**(5), S718-S722.
9. Owens H., Walters G.A. (1995) Clin. Exper. Optometry, **78**(4), 125-129.
10. Bechara S.J., Waring G.O., Insler M.S. (1996) Cornea, **15**(1), 90-93.
11. Parker J., Ko W.W., Pavlopoulos G., Wolfe P.J., Rabinowitz Y.S., Feldman S.T. (1996) J. Refract. Surg., **12**(1), 180-183.
12. Weed K.H., MacEwen C.J., McGhee C.N.J. (2006) Contact Lens Anterior Eye, **29**(3) 123-126.

13. Tuft S.J., Hassan H., George S., Frazer D.G., Willoughby C.E., Liskova P. (2012) *Acta Ophthalmologica*, **90**(6), e482-e486.
14. Nowak D.M., Gajecka M. (2011) *Middle East African J. Ophthalmol.*, **18**(1), 2-6.
15. Hutchings H., Ginisty H., Le Gallo M., Levy D., Stoësser F., Rouland J.F., Arné J.L., Lalaux M.H., Calvas P., Roth M.P., Hovnanian A., Malecaze F. (2005) *J. Medical Genetics*, **42**(1), 88-94. DOI: 10.1136/jmg.2004.022103
16. Tang Y.G., Rabinowitz Y.S., Taylor K.D., Li X., Hu M., Picornell Y., Yang H. (2005) *Genetics Medicine*, **7**(6), 397-405.
17. Kymionis G.D., Blazaki S.V., Tsoularas K.I., Giarmoukakis A.K., Grentzelos M.A., Tsilimbaris M.K. (2017) *J. Refract. Surg.*, **33**(1), 62-63.
18. Burdon K.P., Vincent A.L. (2013) *Clin. Exper. Optometry*, **96**(2), 146-154.
19. Tynismaa H., Sistonen P., Tuupainen S., Tervo T., Dammert A., Latvala T., Alitalo T. (2002) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **43** (10), 3160-3164.
20. Burdon K.P., Coster D.J., Charlesworth J.C., Mills R.A., Laurie K.J., Giunta C., Hewitt A.W., Latimer P., Craig J.E. (2008) *Human Genetics*, **124**(4), 379-386. DOI: 10.1007/s00439-008-0555-z.
21. Brancati F., Valente E.M., Sarkozy A., Fehér J., Castori M., Del Duca P., Mingarelli R., Pizzuti A., Dallapiccola B. (2004) *J. Medical Genetics*, **41**(3), 188-192.
22. Hameed A., Khaliq S., Ismail M., Anwar K., Ebenezer N.D., Jordan T., Mehdi S.Q., Payne A.M., Bhattacharya S.S. (2000) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **41**(3), 629-633.
23. Kirby D., Jackson A., Karbani G., Crow Y. (2005) *Clinical Genetics*, **67**(5), 448-449.
24. Godefrooij D.A., de Wit G.A., Uiterwaal C.S., Imhof S.M., Wisse R.P.L. (2017) *Am. J. Ophthalmol.*, **175**, 169-172.
25. Jonas J.B., Nangia V., Matin A., Kulkarni M., Bhojwani K. (2009) *Am. J. Ophthalmol.*, **148**(5), 760-765.
26. Ziaei H., Jafarinasab M.R., Javadi M.A., Karimian F., Poorsalman H., Mahdavi M., Shoja M.R., Katibeh M. (2012) *Cornea*, **31**(9), 1044-1047. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31823f8d3c.
27. Rong S.S., Ma S.T.U., Yu X.T., Ma L., Chu W.K., Chan T.C.Y., Wang Y.M., Young A.L., Pang C.P., Jhanji V., Chen L.J. (2017) *Sci. Rep.*, **7**(1), 4620. DOI: 10.1038/s41598-017-04393-2.
28. Hughes A.E., Bradley D.T., Campbell M., Lechner J., Dash D.P., Simpson D.A., Willoughby C.E. (2011) *Am. J. Human Genetics*, **89**(5), 628-633.
29. McMahon T.T., Kim L.S., Fishman G.A., Stone E.M., Zhao X.C., Yee R.W., Malicki J. (2009) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **50**(7), 3185-3187. DOI: 10.1167/iovs.08-2886.
30. Piccione M., Serra G., Sanfilippo C., Andreucci E., Sani I., Corsello G. (2012) *Minerva Pediatrica*, **64**(1), 59-64.
31. Nowak D.M., Gajecka M. (2015) *PLoS One*, **10**(7), e0132143. DOI: 10.1371/journal.pone.0132143.
32. Cozma I., Atherley C., James N.J. (2005) *Eye*, **19**(8), 924-925.
33. Georgiou T., Funnell C.L., Cassels-Brown A., O'Connor R. (2004) *Eye*, **18**(4), 379-383. DOI: 10.1038/sj.eye.6700652.
34. Pearson A.R., Soneji B., Sarvananthan N., Sandford-Smith J.H. (2000) *Eye*, **14**(4), 625-628.
35. Gordon-Shaag A., Millodot M., Shneor E., Liu Y. (2015) *BioMed Research International*, **2015**, 795738. DOI: 10.1155/2015/795738.
36. Barbara R., Turnbull A.M.J., Hossain P., Anderson D.F., Barbara A. (2017) in: *Keratoconus. Essentials in Ophthalmology* (Aliy J., ed.) Springer, Cham, Switzerland, pp. 13-23.
37. Malyarchuk B., Derenko M., Grzybowski T., Lunkina A., Czarny J., Rychkov S., Morozova I., Denisova G., Miscicka-Sliwka D. (2004) *Human Biology*, **76**(6), 877-900.
38. Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., Kivisild T., Churnosov M., Evseeva I., Pocheshkhova E., Boldyreva M., Yankovsky N., Balanovska E., Vilems R. (2008) *Am. J. Human Genetics*, **82**(1), 236-250. DOI: 10.1016/j.ajhg.2007.09.019.
39. Heon E., Greenberg A., Kopp K.K., Rootman D., Vincent A.L., Billingsley G., Priston M., Dorval K.M., Chow R.L., McInnes R.R. et al. (2002) *Human Molecular Genetics*, **11**(9), 1029-1036.
40. Semina E.V., Mintz-Hittner H.A., Murray J.C. (2000) *Genomics*, **63**(2), 289-293.
41. Bisceglia L., Ciaschetti M., De Bonis P., Campo P.A.P., Pizzicoli C., Scala C., Grifa M., Ciavarella P., Delle Noci N., Vaira F., Macaluso C., Zelante L. (2005) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **46**(1), 39-45. DOI: 10.1167/iovs.04-0533.
42. Aldave A.J., Yellore V.S., Salem A.K., Yoo G.L., Rayner S.A., Yang H., Tang G.Y., Piconell Y., Rabinowitz Y.S. (2006) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **47**(7), 2820-2822. DOI: 10.1167/iovs.05-1530
43. Liskova P., Ebenezer N.D., Hysi P.G., Gwilliam R., El-Ashry M.F., Moodaley L.C., Hau S., Twa M., Tuft S.J., Bhattacharya S.S. (2007) *Molecular Vision*, **13**, 1887-1891.
44. Tang Y.G., Picornell Y., Su X., Li X., Yang H., Rabinowitz Y.S. (2008) *Cornea*, **27**(2), 189-192.
45. Štabuc-Šilih M., Stražisar M., Hawlina M., Glavač D. (2010) *Cornea*, **29**(2), 172-176.
46. Dash D.P., George S., O'Prey D., Burns D., Nabili S., Donnelly U., Hughes A.E., Silvestri G., Jackson J., Frazer D., Héon E., Willoughby C.E. (2010) *Eye*, **24**(6), 1085-1092. DOI: 10.1038/eye.2009.217.
47. Moschos M.M., Kokolakis N., Gazouli M., Chatziralli I.P., Droutsas D., Anagnou N.P. (2015) *Ophthalmic Genetics*, **36**(3), 213-217. DOI: 10.3109/13816810.2013.843712.
48. Bykhovskaya Y., Margines B., Rabinowitz Y.S. (2016) *Eye And Vision*, **3**(1), 16. DOI: 10.1186/s40662-016-0047-5
49. Lucas S.E.M., Zhou T., Blackburn N.B., Mills R.A., Ellis J., Leo P., Souzeau E., Ridge B., Charlesworth J.C., Lindsay R., Craig J.E., Burdon K.P. (2018) *PLoS One*, **13**(6), e0199178. DOI: 10.1371/journal.pone.0199178.
50. Kaur S.J., McKeown S.R., Rashid S. (2016) *Gene*, **577**(2), 109-118. DOI: 10.1016/j.gene.2015.11.049.
51. Niederer R.L., Perumal D., Sherwin T., McGhee C.N.J. (2008) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **49**(7), 2964-2970. DOI: 10.1167/iovs.07-0968.
52. Behndig A., Karlsson K., Johansson B.O., Brännström T., Marklund S.L. (2001) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **42**(10), 2293-2296.
53. Udar N., Atilano S.R., Brown D.J., Holguin B., Small K., Nesburn A.B. (2006) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **47**(8), 3345-3351. DOI: 10.1167/iovs.05-1500.
54. De Bonis P., Laborante A., Pizzicoli C., Stallone R., Barbano R., Longo C., Mazzilli E., Zelante L., Bisceglia L. (2011) *Molecular Vision*, **17**, 2482-2494.
55. Тутоян К.Х., Хасанова Р.Р., Лобов С.Л., Джемилева Л.У., Усубов Э.Л., Бикбов М.М., Хуснутдинова Э.К. (2017) В кн.: Молекулярная диагностика 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, сс. 435-436.

56. Krafchak C.M., Pawar H., Moroi S.E., Sugar A., Lichter P.R., Mackey D.A., Mian S., Nairus T., Elnor V., Scheingart M.T. et al. (2005) *Am. J. Human Genetics*, **77**(5), 694-708.
57. Vandewalle C., Van Roy F., Berx G. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**(5), 773-787.
58. Yellore V.S., Rayner S.A., Nguyen C.K., Gangalum R.K., Jing Z., Bhat S.P., Aldave A.J. (2012) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **53**(1), 273-278.
59. Okumura N., Minamiyama R., Ho L.T., Kay E.P., Kawasaki S., Tourtas T., Schlötzer-Schrehard U., Kruse F.E., Young R.D., Quantock A.J., Kinoshita S., Koizumi N. (2015) *Lab. Invest.*, **95**(11), 1291-304. DOI: 10.1038/labinvest.2015.111.
60. Stachs O., Bochert A., Gerber T., Koczan D., Thiessen H.J., Guthoff R.F. (2004) *Der Ophthalmologe*, **101**(4), 384-389.
61. Lechner J., Dash D.P., Muszynska D., Hosseini M., Segev F., George S., Frazer D.G., Moore J.E., Kaye S.B., Young T., Simpson D.A., Churchill A.J., Héon E., Willoughby C.E. (2013) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **54**(5), 3215-3223.
62. Mazzotta C., Traversi C., Raiskup F., Lo Rizzo C., Renieri A. (2014) *Case Reports Ophthalmol.*, **5**(3), 281-288. DOI: 10.1159/000367937.
63. Liskova P., Palos M., Hardcastle A.J., Vincent A.L. (2013) *JAMA Ophthalmol.*, **131**(10), 1296-1303.
64. Runager K., Klintworth G.K., Karring H., Enghild J.J. (2013) *Biochemistry*, **52**(16), 2821-2827. DOI: 10.1021/bi400212m.
65. Stenvang M., Schafer N.P., Malmos K.G., Pérez A.-M.W., Niembro O., Sormanni P., Basaiawmoit R.V., Christiansen G., Andreasen M., Otzen D.E. (2018) *J. Mol. Biol.*, **430**(8), 1116-1140. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.03.001.
66. García-Castellanos R., Nielsen N.S., Runager K., Thøgersen I.B., Lukassen M.V., Poulsen E.T., Goulas T., Enghild J.J., Gomis-Rüth F.X. (2017) *Structure*, **25**(11), 1740-1750. DOI: 10.1016/j.str.2017.09.001.
67. Guan T., Liu C., Ma Z., Ding S. (2012) *Gene*, **503**(1), 137-139. DOI: 10.1016/j.gene.2012.04.061.
68. Mathew J.H., Goosey J.D., Bergmanson J.P.G. (2011) *Optometry Vision Sci.*, **88**(8), 988-997. DOI: 10.1097/OPX.0b013e31821ffbd4.
69. Karolak J.A., Polakowski P., Szaflik J., Szaflik J.P., Gajecka M. (2016) *Ophthalmic Genetics*, **37**(1), 37-43. DOI: 10.3109/13816810.2014.926375.
70. Udar N., Kenney M.C., Chalukya M., Anderson T., Morales L., Brown D., Nesburn A., Small K. (2004) *Cornea*, **23**(1), 13-17.
71. Gajecka M., Radhakrishna U., Winters D., Nath S.K., Rydzanicz M., Ratnamala U., Ewing K., Molinari A., Pitarque J.A., Lee K., Leal S.M., Bejjani B.A. (2009) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **50**(4), 1531-1539.
72. Czugała M., Karolak J.A., Nowak D.M., Polakowski P., Pitarque J., Molinari A., Rydzanicz M., Bejjani B.A., Yue B.Y., Szaflik J.P., Gajecka M. (2012) *Eur. J. Human Genetics*, **20**(4), 389-397. DOI: 10.1038/ejhg.2011.203.
73. Karolak J.A., Rydzanicz M., Ginter-Matuszewska B., Pitarque J.A., Molinari A., Bejjani B.A., Gajecka M. (2015) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **56**(13), 7687-7690. DOI: 10.1167/iovs.15-17538.
74. Pothula S., Bazan H.E.P., Chandrasekhar G. (2013) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **54**(8), 5343-5352. DOI: 10.1167/iovs.13-11955.
75. Li X., Rabinowitz Y.S., Tang Y.G., Picornell Y., Taylor K.D., Hu M., Yang H. (2006) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **47**(9), 3791-3795. DOI: 10.1167/iovs.06-0214.
76. Smith-Mungo L.I., Kagan H.M. (1998) *Matrix Biology*, **16**(7), 387-398.
77. Lee V.S., Halabi C.M., Hoffman E.P., Carmichael N., Leshchiner I., Lian C.G., Bierhals A.J., Vuzman D., Brigham Genomic Medicine, Mecham R.P., Frank N.Y., Stitzel N.O. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**(31), 8759-8764. DOI: 10.1073/pnas.1601442113.
78. Shetty R., Sathyanarayanamoorthy A., Ramachandra R.A., Arora V., Ghosh A., Srivatsa P.R., Pahuja N., Nuijts R.M., Sinha-Roy A., Mohan R.R., Ghosh A. (2015) *Molecular Vision*, **21**, 12-25.
79. Dudakova L., Liskova P., Trojek T., Palos M., Kalasova S., Jirsova K. (2012) *Experimental Eye Research*, **104**, 74-81. DOI: 10.1016/j.exer.2012.09.005.
80. Bykhovskaya Y., Li X., Epifantseva I., Haritunians T., Siscovick D., Aldave A., Szczotka-Flynn L., Iyengar S.K., Taylor K.D., Rotter J.I., Rabinowitz Y.S. (2012) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **53**(7), 4152-4157. DOI: 10.1167/iovs.11-9268.
81. Zhang J., Zhang L., Hong J., Wu D., Xu J. (2015) *PLoS One*, **10**(12), e0145815. DOI: 10.1371/journal.pone.0145815.
82. Dudakova L., Palos M., Jirsova K., Stranecky V., Krepelova A., Hysi P.G., Liskova P. (2015) *Eur. J. Human Genetics*, **23**(11), 1581-1583. DOI: 10.1038/ejhg.2015.28.
83. Bisceglia L., De Bonis P., Pizzicoli C., Fischetti L., Laborante A., Di Perna M., Giuliani F., Delle Noci N., Buzzonetti L., Zelante L. (2009) *Investigative Ophthalmology Visual Science*, **50**(3), 1081-1086. DOI: 10.1167/iovs.08-2382.
84. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. (2003) *Physiol. Rev.*, **83**(3), 731-801. DOI: 10.1152/physrev.00029.2002.
85. Lin Z., Zhao J., Nitoiu D., Scott C.A., Plagnol V., Smith F.J., Wilson N.J., Cole C., Schwartz M.E., McLean W.H. et al. (2015) *Am. J. Human Genetics*, **96**(3), 440-447. DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.12.026.
86. Persson H., Kawashima S., Karlsson J.O. (1993) *Brain Res.*, **611**(2), 272-278.
87. Li X., Bykhovskaya Y., Tang Y.G., Picornell Y., Haritunians T., Aldave A.J., Szczotka-Flynn L., Iyengar S.K., Rotter J.I., Taylor K.D., Rabinowitz Y.S. (2013) *Cornea*, **32**(5), 696-701. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3182821c1c.
88. Kashtan C.E., Ding J., Garosi G., Heidet L., Massella L., Nakanishi K., Nozu K., Renieri A., Rheault M., Wang F., Gross O. (2018) *Kidney International*, **93**(5), 1045-1051. DOI: 10.1016/j.kint.2017.12.018.
89. Badenas C., Praga M., Tazón B., Heidet L., Arrondel C., Armengol A., Andrés A., Morales E., Camacho J.A., Lens X., Dávila S., Milà M., Antignac C., Darnell A., Torra R. (2002) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13** (5), 1248-1254.
90. Štabuc-Šilih M., Ravnik-Glavac M., Glavac D., Hawlina M., Strazisar M. (2009) *Molecular Vision*, **15**, 2848-2860.
91. Kokolakis N.S., Gazouli M., Chatziralli I.P., Koutsandrea C., Gatziofufas Z., Peponis V.G., Droutsas K.D., Kalogeropoulos C., Anagnou N., Miltakakis D., Moschos M.M. (2014) *Ophthalmic Genetics*, **35**(4), 226-228. DOI: 10.3109/13816810.2014.946055.
92. Karolak J.A., Kulinska K., Nowak D.M., Pitarque J.A., Molinari A., Rydzanicz M., Bejjani B.A., Gajecka M. (2011) *Molecular Vision*, **17**, 827-843.
93. Aldave A.J., Bourla N., Yellore V.S., Rayner S.A., Khan M.A., Salem A.K., Sonmez B. (2007) *Cornea*, **26**(8), 963-965. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31811dfaf7.
94. Smith S.M., Birk D.E. (2012) *Experimental Eye Research*, **98**(1), 105-106. DOI: 10.1016/j.exer.2010.08.003.

95. Segev F, Héon E., Cole W.G., Wenstrup R.J., Young F., Slomovic A.R., Rootman D.S., Whitaker-Menezes D., Chervoneva I., Birk D.E. (2006) Investigative Ophthalmology Visual Science, **47**(2), 565-573. DOI: 10.1167/iovs.05-0771.
96. Schwarze U., Atkinson M., Hoffman G.G., Greenspan D.S., Byers P.H. (2000) Am. J. Human Genetics, **66**(6), 1757-1765.
97. De Paepe A., Nuytinck L., Hausser I., Anton-Lamprecht I., Naeyaert J.M. (1997) Am. J. Human Genetics, **60**(3), 547-554.
98. Li X., Bykhovskaya Y., Canedo A.L., Haritunians T., Siscovick D., Aldave A.J., Szczotka-Flynn L., Iyengar S.K., Rotter J.I., Taylor K.D., Rabinowitz Y.S. (2013) Investigative Ophthalmology Visual Science, **54**(4), 2696-2704. DOI: 10.1167/iovs.13-11601.
99. Lu Y., Vitart V., Burdon K.P., Khor C.C., Bykhovskaya Y., Mirshahi A., Hewitt A.W., Koehn D., Hysi P.G., Ramdas W.D., Zeller T. et al. (2013) Nature Genetics, **45**(2), 155-163. DOI: 10.1038/ng.2506.
100. Sahebjada S., Schache M., Richardson A.J., Snibson G., MacGregor S., Daniell M., Baird P.N. (2013) Investigative Ophthalmology Visual Science, **54**(13), 8224-8228.
101. Liskova P., Dudakova L., Krepelova A., Klema J., Hysi P.G. (2017) PLoS One, **12**(2), e0172365. DOI: 10.1371/journal.pone.0172365.
102. Nakamura T., Mizuno S. (2010) Proceeds of Japan Academy, Series B, **86**(6), 588-610. DOI: 10.2183/pjab.86.588.
103. Schultz J.M., Khan S.N., Ahmed Z.M., Riazuddin S., Waryah A.M., Chhatre D., Starost M.F., Ploplis B., Buckley S., Velásquez D. et al. (2009) Am. J. Human Genetics, **85**(1), 25-39. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.06.003.
104. Li Q., Weng J., Mohan R.R., Bennett G.L., Schwall R., Wang Z.F., Tabor K., Kim J., Hargrave S., Cuevas K.H., Wilson S.E. (1996) Investigative Ophthalmology Visual Science, **37**(5), 727-739.
105. Miyagi H., Thomasy S.M., Russell P., Murphy C.J. (2018) Experimental Eye Research, **166**, 49-55. DOI: 10.1016/j.exer.2017.10.006.
106. You J., Corley S.M., Wen L., Hodge C., Höllhumer R., Madigan M.C., Wilkins M.R., Sutton G. (2018) Sci. Rep., **8**(1), 389. DOI: 10.1038/s41598-017-18480-x.
107. Burdon K.P., Macgregor S., Bykhovskaya Y., Javadiyan S., Li X., Laurie K.J., Muszynska D., Lindsay R., Lechner J., Haritunians T., Henders A.K. et al. (2011) Investigative Ophthalmology Visual Science, **52**(11), 8514-8519. DOI: 10.1167/iovs.11-8261.
108. Sahebjada S., Schache M., Richardson A.J., Snibson G., Daniell M., Baird P.N. (2014) PLoS One, **9**(1), e84067. DOI: 10.1371/journal.pone.0084067.
109. Li X., Bykhovskaya Y., Haritunians T., Siscovick D., Aldave A., Szczotka-Flynn L., Iyengar S.K., Rotter J.I., Taylor K.D., Rabinowitz Y.S. (2012) Human Molecular Genetics, **21**(2), 421-429. DOI: 10.1093/hmg/ddr460.
110. Boehme S.A., Franz-Bacon K., DiTirro D.N., Ly T.W., Bacon K.B. (2016) PLoS One, **11**(5), e0154874. DOI: 10.1371/journal.pone.0154874.
111. Bae H.A., Mills R.A., Lindsay R.G., Phillips T., Coster D.J., Mitchell P., Wang J.J., Craig J.E., Burdon K.P. (2013) Investigative Ophthalmology Visual Science, **54**(7), 5132-5135. DOI: 10.1167/iovs.13-12377.
112. Cai C., Rajaram M., Zhou X., Liu Q., Marchica J., Li J., Powers R.S. (2012) Cell Cycle, **11**(9), 1773-1781. DOI: 10.4161/cc.20121.
113. Cao Y., Mitchell E.B., Gorski J.L., Hollinger C., Hoppman N.L. (2016) Am. J. Medical Genetics. Part A., **170**(12), 3276-3281. DOI: 10.1002/ajmg.a.37892.
114. Cuellar-Partida G., Springelkamp H., Lucas S.E., Yazar S., Hewitt A.W., Iglesias A.I., Montgomery G.W., Martin N.G., Pennell C.E., van Leeuwen E.M., Hofman A. et al. (2015) Human Molecular Genetics, **24**(17), 5060-5068. DOI: 10.1093/hmg/ddv211.
115. Hsu R.J., Ho J.Y., Cha T.L., Yu D.S., Wu C.L., Huang W.P., Chu P., Chen Y.H., Chen J.T., Yu C.P. (2012) PLoS One, **7**(10), e47649. DOI: 10.1371/journal.pone.0047649.
116. Van Geel M., Gattas M., Kesler Y., Tong P., Yan H., Tran K., Steijlen P.M., Murrell D.F., Van Steensel M.A. (2010) Br. J. Dermatol., **162** (6), 1403-1406. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.09703.x.
117. Mues G., Bonds J., Xiang L., Vieira A.R., Seymen F., Klein O., D'Souza R.N. (2014) Am. J. Medical Genetics. Part A., **164** (10), 2455-2460. DOI: 10.1002/ajmg.a.36520.
118. Nakatsu M.N., Ding Z., Ng M.Y., Truong T.T., Yu F., Deng S.X. (2011) Investigative Ophthalmology Visual Science, **52**(14), 3941-3941. DOI: 10.1167/iovs.10-6486.

Поступила в редакцию: 06. 10. 2018.
После доработки: 27. 01. 2019.
Принята к печати: 29. 01. 2019.

SEARCH FOR GENETIC MARKERS FOR PRECISE DIAGNOSTICS OF KERATOCONUS

L.O. Skorodumova^{1}, A.V. Belodedova², E.I. Sharova¹, B.E. Malyugin²*

¹Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: l.skorodumova@rcpcm.org

²Fyodorov Eye Microsurgery Complex Federal State Institution,
59a Beskudnikovskiy blvd., Moscow, 127486 Russia

Keratoconus is a chronic disorder of the cornea, characterized by its progressive thinning, stretching, and conical protrusion. Diagnostics of subclinical keratoconus, as well as its early stages (*forme fruste*), is a complex problem. The presence of these forms of keratoconus in a patient is one of the reasons for the development of keratectasia after laser refractive surgery. Currently, the role of genetic factors in keratoconus development has been proven. This indicates the possibility of diagnostics of subclinical and forme fruste keratoconus using genetic markers. Knowledge about the patient's genetic susceptibility to keratoconus would allow correcting the tactics of treatment of refractive anomalies and avoiding serious side effects. The studies of causal mutations indicate the genetic heterogeneity of keratoconus, which complicates the development of a diagnostic panel. Selection of candidate variants from the currently known ones based on clear criteria may be one of the approaches for diagnostic markers search. In this review, we have analyzed articles on keratoconus markers in order to form a list of candidate variants for genotyping in the Russian population. The selection criteria took into account the complexes of symptoms in which a marker was found, populations in which a particular marker was investigated, the presence and results of replication studies. The analysis included markers in *VSX1*, *SOD1*, *ZEB1*, *LOX*, *CAST*, *DOCK9*, *TGFBI*, *HGF*, *MAP3K19*, *KCND3*, *COL4A3*, *COL4A4*, *COL5A1*, *FNDC3B*, *FOXO1*, *BANP-ZNF469*, *MPDZ-NF1B*, *WNT10A* genes. Based on the results of the analysis, the following candidate variants were selected for genotyping in the Russian population of patients with keratoconus: rs1536482 and rs7044529 in the *COL5A1* gene, rs5745752 and rs2286194 in the *HGF* gene, rs4954218 in the *MAP3K19* gene, rs4839200 near the *KCND3* gene, rs2721051 near the *FOXO1* gene, rs1324183 between the *MPDZ* and the *NF1B* genes, and rs121908120 in the *WNT10A* gene.

Key words: keratoconus; genetic markers; *VSX1*; *SOD1*; *ZEB1*; *LOX*