

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA  
TEZĂ DE DOCTORAT**

**„Condiționarea genetică a Glaucomului Primitiv cu Unghi Deschis”**

**-REZUMAT-**

Doctorand  
**Anda-Maria Șter**

Conducător științific  
**Prof.dr. Victor Ioan Pop**

**CUPRINS**

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Glaucomul primitiv cu unghi deschis</b>	17
1.1. Generalități	17
1.2. Factori de risc asociați Glaucomului primitiv cu unghi deschis	19
<b>2. Biologia moleculară a glaucomului primitiv cu unghi deschis</b>	23
2.1. Presiunea intraoculară și tulburările vasculare	26
2.2. Variante ale unor gene cu patogenicitate certă	26
2.3. Variante ale unor gene posibil implicate în etiopatogenie	31
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	41
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43
<b>2. Metodologie generală</b>	45
2.1. Lotul de studiu	45
2.2. Analiza moleculară a ADN-ului	47
2.2.1. Izolarea și purificarea ADN-ului genomic	47
2.2.2. Tehnica PCR-RFLP	49
2.2.2.1. Amplificarea fragmentelor de ADN(PCR)	50
2.2.2.2. Digestia ADN cu enzime de restricție	51
2.2.2.3. Separarea fragmentelor de ADN	52
2.2.2.4. Detecția fragmentelor de ADN	52
2.4. Analiza statistică	53
<b>3. Studiul 1- Rolul polimorfismelor genice GSTM1, GSTT1 în etiopatogenia glaucomului primitiv cu unghi deschis</b>	55
<b>3.1. Introducere</b>	55
<b>3.2. Obiective</b>	56
<b>3.3. Material și metodă</b>	57
3.3.1. Lotul de studiu	57
3.3.2. Variante genice analizate	58
3.3.3. Analiza statistică	58
3.3.4. Descrierea tehnicilor de genetică moleculară	58
<b>3.4. Rezultate</b>	60
<b>3.5. Discuții</b>	68
<b>4. Studiul 2- Influența polimorfismului TGFB2 rs991967 asupra glaucomului primitiv cu unghi deschis</b>	75
<b>4.1. Introducere</b>	75
<b>4.2. Obiective</b>	77

<b>4.3. Material și metodă</b>	77
4.3.1. Lotul de studiu	77
4.3.2. Variante genice analizate	77
4.3.3. Analiza statistică	78
4.3.4. Descrierea tehnicilor de genetică moleculară	78
<b>4.4. Rezultate</b>	80
<b>4.5. Discuții</b>	86
<b>5. Concluzii generale</b>	91
<b>6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	95
<b>REFERINȚE</b>	97
<b>ABREVIERI</b>	12

**Cuvinte cheie:** glaucom primitiv cu unghi deschis, polimorfisme genetice, GST, TGF- $\beta_2$

## Stadiul actual al cunoașterii

Văzul face parte din cele cinci simțuri prin care omul intră în contact mediul înconjurător. Este complex atât din punct de vedere al informației transmise, al căilor de propagare, cât și din punct de vedere al proceselor corticale declanșate. Marchează viața exterioară a individului, reflectată în activitatea socială și profesională a acestuia dar și cea interioară manifestată în gânduri, emoții, trăiri. Funcția vizuală participă la intrarea în relația a individului cu mediul extern dar și cu sine însuși.

Pierderea vederii comportă consecințe devastatoare asupra individului. La momentul actual, glaucomul este principala cauză de orbire ireversibilă la nivel global. Dacă în 2002 erau recunoscute ~4,5 milioane de cazuri de cecitate secundară glaucomului primitiv, studiile estimează creșterea numărului de cazuri până la ~11,1 milioane în 2020. În paralel, numărul bolnavilor cu glaucomul primitiv va atinge cote alarmante, ~76 milioane la nivel global, cele mai multe cazuri fiind atribuite glaucomului primitiv cu unghi deschis (GPUD), principala formă de glaucom responsabil de ~74% din cazuri. „Riscul orbirii unilaterale în GPUD tratat este de aproximativ 15% la 15 ani, iar cel al orbirii bilaterale în GPUD tratat este de 6% la 15 ani”. Acest risc depinde în mare măsură de momentul diagnosticului, de calitatea și aderența la tratament, de monitorizarea evoluției și de ajustarea permanentă a tratamentului nevoilor pacientului.

GPUD reunește un grup de neuropatii optice cronice, progresive, caracterizate prin alterări morfologice specifice ale papilei nervului optic (PNO) și ale stratului de fibre nervoase (RNFL), în absența unor boli oculare sau a unor anomalii congenitale. Acestea sunt secundare pierderii progresive de celule ganglionare retiniene (CGR) și determină apariția defectelor de câmp vizual (CV). Totodată, prezintă un grad variabil de heterogenicitate genetică, severitate clinică și expresie fenotipică și mai multe moduri de transmitere ereditară.

Având o evoluție clinică silențioasă, majoritatea bolnavilor cu GPUD sunt diagnosticați tardiv, când leziunile sunt avansate și calitatea vieții iremediabil afectată. Aspectele epidemiologice particulare atrag atenția asupra necesității de implementare a unor strategii de screening și diagnostic precoce a afecțiunii, care să permită instituirea cât mai rapidă a terapiei preferabil individualizate, în vederea creșterii ratei de supraviețuire a fibrelor nervoase și menținerii calității vieții acestor pacienți. În realizarea acestui demers, înțelegerea mecanismelor etiopatogenetice este esențială.

Presiunea intraoculară ridicată rămâne principalul factor de risc ocular identificat, majoritatea opțiunilor terapeutice fiind direcționate împotriva ei. Controlul acesteia de dovedește însă insuficient în managementul pacientului cu GPUD: doar o treime din pacienții cu GPUD manifestă valori crescute ale PIO în stadiile inițiale, există forme ale bolii care avansează în ciuda controlului TIO, după cum există cazuri de Hipertensiune Intraoculară care nu dezvoltă leziuni caracteristice neuropatiei glaucomatoase sau forme de glaucom care evoluează cu TIO în limite statistic normale. Au fost identificați și alți factori care favorizează apariția GPUD: vârsta înaintată, sexul masculin, rasele afro-americană și afro-caraibiană, miopia, pseudoexfolierea capsulară, presiunea de perfuzie oculară scăzută, istoricul familial de glaucom.

În urma studiilor biochimice, imuno-histochimice, histopatologice și genetice nu a fost posibilă identificarea cauzei acestei boli, fiind emise o serie de ipoteze etiopatogenetice, fiecare contribuind parțial la apariția fenomenelor degenerative observate în GPUD la nivel trabecular și la nivelul papilei nervului optic. Printre acestea se numără: compresia mecanică a fibrelor nervoase secundară PIO crescute, alterări ale microcirculației locale, mutația unor gene specifice, creșterea concentrației glutamatului, alterarea metabolismului oxidului nitric, mutații/alterări mitocondriale, efectul distructiv al speciilor reactive ale oxigenului și nitrogenului.

Riscul de până la 9,2 ori mai mare de apariția a GPUD la rudele de gradul I al pacienților a oferit premisa unei componente genetice în etiopatogenia bolii. Au permis identificarea unor loci cromozomiali și a unor "gene cu patogenicitate certă", implicate în apariția formelor mendeliene ale bolii: *MYOC*, *OPTN*, *WDR36*, *NTF4*, *CYP1B1*. Totodată, plecând de la ipotezele etiopatogenetice anterior conturate, a fost posibilă evidențierea unei serii de "gene asociate" drept potențiali factori de risc în apariția GPUD. Printr-un aport variabil în cadrul interacțiunilor inter-genice și de mediu, acestea ar putea fi implicate în dezvoltarea formelor non-mendeliene, multifactoriale ale bolii. În această lucrare dorim să ne oprim asupra acestor ultime forme ale bolii, larg răspândite în rândul populației.

Implicațiile patologice ale stres-ului oxidativ au fost obiectivate în o multitudine de afecțiuni printre care și GPUD. Țesuturile oculare dispun de importante mecanisme antioxidante glutation S-transferazele numărându-se printre cele mai importante. Pacienții cu GPUD par să manifeste un deficit al potențialului antioxidant local și sistemic, fiind în același timp expuși unei producții crescute de specii reactive ale oxigenului și nitrogenului datorate: mutațiilor mitocondriale, creșterii concentrațiilor de TGF- $\beta_2$  în UA și la nivelul PNO, tulburărilor vasculare frecvent asociate. Imposibilitatea acestor pacienți de a neutraliza acțiunea nocivă a acestor compuși toxici, pare să se repercute asupra celulelor trabeculare, alterând căile de drenaj ale umorului apos cu creșterea valorilor PIO. Dacă acestea depășesc toleranța presoare individuală, parmetru specific fiecărui individ, consecințele PIO crescute se repercutează direct sau indirect asupra celulelor ganglionare retiniene, amorșând fenomene degenerative ale acestora. În acest context, studiul variațiilor genetice ale genelor care codică enzimele GST, s-a dovedit de interes, furnizând date referitoare la potențialul antioxidant al pacienților cu GPUD.

Plecând de la concentrațiile crescute ale TGF- $\beta_2$  la nivelul UA și al PNO în GPUD dar și de la rolul profibrotic descris în numeroase patologii, s-a conturat o altă ipoteză etiopatogenetică. Conform acesteia, TGF- $\beta_2$  ar putea fi principalul mediator al proceselor de remodelare matriceală observate în GPUD: modifică fenotipul celulelor trabeculare; favorizează procesele de sinteză și depunere a MEC, inhibând în același timp fenomenele de degradare a MEC trabecular și papilar; facilitează peroxidarea lipidelor cu formarea SRO. Are loc alterarea drenajului UA, creșterea PIO cu declanșarea consecutivă a fenomenelor degenerative ganglionare. Studiul variațiilor genetice al genei *TGFB2*, ar putea explica concentrațiile crescute ale TGF- $\beta_2$  și implicațiile acestui factor în etiopatogenia GPUD.

## **Contribuția personală**

### **1. Ipoteza de lucru/Obiective**

Această lucrare pleacă de la premisa unui determinism multifactorial al GPUD și dorește să evalueze potențiali factori de risc genetic ai acestei boli. Conform **teoriei eredității poligenice cu prag**, susceptibilitatea individului la aceste forme multifactoriale ale bolii, este dictată de numărul alelelor de risc moștenite de la ambii părinți; cu cât mai mare este numărul alelelor de risc moștenite, cu atât mai

mare este susceptibilitatea individului față de boală. Factorii de mediu pot valida sau nu acest potențial genetic, transformând vulnerabilitatea genetică în boală. Identificarea variantelor alelice implicate în producerea susceptibilității la boală, a modului prin care un anumit genotip în urma interacțiunii cu anumiți factori de mediu transformă vulnerabilitate genetică în boală, va permite stabilirea mijloacelor adevrate de prevenție și tratament patogenetic.

Polimorfismele studiate ca factori de risc nu au fost alese întâmplător. Enzimele GST sunt responsabile de îndepărtarea xenobioticelor exogene și endogene prin conjugarea cu glutatiunul. Polimorfismele nule ale enzimelor GSTM1, GSTT1 au fost asociate cu acumularea leziunilor stresului oxidativ, apariția unor neoplazii sau maladii degenerative și chiar a glaucomului. În ciuda numeroaselor studii, rolul acestora în etiopatogenia GPUD rămâne ambiguu. Dorind să evaluăm impactul acestora asupra riscului de glaucom în Transilvania, am inclus cele două polimorfisme printre variantele genice studiate. Concentrațiile crescute ale TGF- $\beta_2$  la nivelul UA și al PNO la pacienții cu GPUD susțin implicarea acestuia în apariția fenomenelor de remodelare matriceală trabeculară și papilară observate la aceștia. Studiul polimorfismelor genei codificatoare TGFB2 ar putea explica expresia crescută a factorului în glaucom. Din acest considerent, în lucrarea de față, am considerat oportună evaluarea polimorfismului *TGFB2* rs991967 ca factor de risc al GPUD.

## **1. Metodologie generală a cercetării**

### **1.1. Lotul de studiu**

Lucrarea de față a fost construită sub forma unui studiu observațional, retrospectiv, caz-control și a avut ca scop evaluarea asocierii polimorfismelor GSTM1, GSTT1 și *TGFB2* rs991967 cu GPUD în cadrul unui studiu caz-martor. În acest sens am analizat genetic 292 de persoane din care 155 de pacienți cu GPUD care au constituit lotul de studiu și 137 de persoane sănătoase/pacienți fără glaucom care au alcătuit lotul martor. Aceștia au fost recrutați din rândul pacienților care s-au prezentat pentru monitorizare sau diagnostic și tratament în Clinica de Oftalmologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj în perioada 2012-2013. După realizarea unei anamneze riguroase și completarea unei fișe individuale care a inclus antecedentele heredocolaterale, antecedentele personale patologice, condițiile de viață și de muncă, tratamente urmate la momentul respectiv, pacienții au fost supuși examenului oftalmologic. În funcție de rezultatele obținute și de criteriile de selecție în cele două loturi, pacienții au fost repartizați în unul dintre grupuri sau excluși din studiu.

### **1.2. Analiza moleculară a ADN-ului**

Analiza genetică a probelor a fost realizată în cadrul Laboratorului de Genetică al Catedrei de Genetică Medicală din cadrul UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. În vederea realizării acestora a fost necesară recoltarea unei probe de sânge venos periferic în vacutainere cu EDTA care au fost păstrate la +4°C până în momentul utilizării.

În prima etapă a avut loc izolarea și purificarea ADN-ului genomic cu ajutorul unor kit-uri comerciale. În urma izolării ADN-ului genomic, secvențele ADN de interes au fost amplificate selectiv cu ajutorul PCR, reacția de polimerizare în lanț a fragmentelor ADN. Producții de amplificare au fost supuși digestiei enzimatică cu enzime de restricție specifice. Fragmentele de ADN obținute în urma digestiei enzimatică au fost separate prin tehnica migrării electroforetice în gel de agaroză. Ulterior a avut loc identificarea fragmentelor ADN de interes, care a presupus vizualizarea fragmentelor amplificate și digerate într-un sistem special de vizualizare a gelurilor care folosește lumina ultravioletă.

### **1.3. Analiza statistică**

Datele au fost centralizate într-o bază de date tip Excel. Pentru prelucrarea statistică am utilizat programe de analiza statistica: Statistica v.8.0, și mediul avansat de programare statistica și grafica, R versiunea 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Datele cantitative au fost sintetizate cu ajutorul indicatorilor de centralitate, dispersie și localizare în timp ce, datele calitative au fost sumarizate folosind frecvențe absolute (număr subiecți) și relative (procente, %).

Testul parametric Student (t) cu varianțe egale sau inegale a fost utilizat pentru evaluarea diferențelor caracteristicilor continue pe cele două grupuri independente.

Evaluarea semnificației statistice a asocierilor a două variabile nominale a fost realizată prin testul Chi-pătrat sau testul Exact al lui Fisher.

Testul Chi-pătrat a fost utilizat și pentru a vedea dacă distribuția genotipurilor respectă echilibrul Hardy-Weinberg, un rezultat semnificativ marcând absența echilibrului Hardy-Weinberg pentru populația de studiu.

Regresia logistică binară a fost utilizată pentru determinarea factorilor de risc independenți pentru prezența glaucomului în timp ce, modelul regresiei logistice ordinale și multinomiale a fost folosit pentru studiul dependențelor dintre factorii demografici, clinici și stadiul glaucomului, acesta din urmă fiind clasificat ca: incipient, moderat, sever. Mărimea efectului în cazul asocierilor statistic semnificative a fost realizată prin calculul raportului șansei (odds ratio, OR) și a intervalului de încredere de 95% asociat. În prima etapă a analizei de regresie, efectul fiecărui factor considerat asupra stadiului glaucomului fost analizat separat, univariat considerându-se ca posibile variabile exogene pentru modelul multivariabil, acei factori cu nivelul de semnificație estimat,  $p < 0.25$ . Etapa a doua a regresiei logistice a constat în testarea mai multor modele aditive imbricate și compararea acestora prin testul diferenței în Chi-pătrat (Likelihood Ratio Test) sau indici precum Criteriul Informational Bayesian (BIC) și Criteriul Informational al lui Akaike (AIC).

Nivelul de semnificație ales în cazul tuturor testelor bilaterale a fost  $\alpha = 0.05$ . Semnificația statistică a fost data de un nivel de semnificație estimat,  $p < 0.05$ .

## **2. Studiul 1- Rolul polimorfismelor genice *GSTM1*, *GSTT1* în etiopatogenia glaucomului primitiv cu unghi deschis**

### **2.1. Introducere**

Implicațiile patologice ale stresului oxidativ au fost obiectivate în o multitudine de afecțiuni printre care și GPUD. Țesuturile oculare dispun de importante mecanisme antioxidante, glutathion S-transferazele numărându-se printre cele mai importante. Pacienții cu GPUD par să manifeste un deficit al potențialului antioxidant local și sistemic, fiind în același timp expuși unei producții crescute de specii reactive ale oxigenului și nitrogenului datorate tulburărilor vasculare frecvent asociate. Imposibilitatea acestor pacienți de a neutraliza acțiunea nocivă a acestor compuși toxici, pare să se repercute asupra celulelor trabeculare, alterând căile de drenaj și PIO dar și asupra CGR, participând la fenomenele degenerative ale acestora

În acest context, Genele care codifică glutathion S-transferazele sunt de interes considerabil privind susceptibilitatea la GPUD, motiv pentru care, în studiul de față, am ales analiza variantelor genice ale *GSTM1* și *GSTT1* într-un grup de pacienți cu GPUD din Transilvania, România.

### **2.2. Obiective**

#### **Obiective principale**

- Genotiparea polimorfismelor enzimelor *GSTM1*, *GSTT1* ;
- Evaluarea asocierii dintre GPUD și genotipurile *GSTM1* nul, *GSTT1* nul și stratificată în funcție de sex ;
- Evaluarea asocierii dintre GPUD și genotipurile *GSTM1* nul, *GSTT1* nul în funcție de sex;
- Evaluarea asocierii dintre GPUD și combinațiile genotipice *GSTM1-GSTT1*;
- Evaluarea asocierii dintre GPUD și combinațiile genotipice *GSTM1-GSTT1* și în funcție de sex;
- Analiza comparativă a genotipurilor *GSTM1*, *GSTT1* în lotul pacienților în funcție de prezența istoricului familial, a factorilor de risc extraoculari și a tratamentului chirurgical al glaucomului în antecedente;

- Evaluarea asocierii dintre polimorfismele *GSTM1*, *GSTT1*, combinațiile acestora și stadiul de glaucom;
- Evaluarea efectului individual al polimorfismelor *GSTM1*, *GSTT1* și combinațiilor acestora asupra prezentei glaucomului;
- Evaluarea efectului individual al polimorfismelor *GSTM1*, *GSTT1* și combinațiilor acestora asupra stadiului glaucomului;
- Evaluarea efectului ajustat al polimorfismelor *GSTM1*, *GSTT1* și combinațiilor acestora asupra stadiului glaucomului, ajustare realizată ținând cont și de alți posibili predictorii (istoricul familial de glaucom, factorii de risc extraoculari, durata bolii peste 10 ani);

### Obiective secundare

- Adaptarea și implementarea în practica medicală a protocoalelor de lucru pentru analiza polimorfismelor *GSTM1*, *GSTT1*;
- Completarea informațiilor lipsă privind frecvența alelelor și a genotipurilor studiate în populația din Transilvania, datele existente la momentul actual fiind puține sau inexistente chiar;

### 2.3. Material și metodă

Studiul de față s-a desfășurat sub forma unui studiu caz-martor și a inclus cele două loturi descrise în detaliu în subcapitolul 2.1. Rolul stresului oxidativ în etiopatogenia GPUD a fost studiat indirect, prin evaluarea polimorfismelor enzimelor GST cu important rol antioxidant, *GSTM1* (mu 1) și *GSTT1* (teta 1). Pentru genotiparea *GSTM1*, *GSTT1* am folosit tehnica PCR multiplex. Au fost genotipate următoarele variante genice:

- Polimorfismele genei *GSTM1*(alela nulă M1)
- Polimorfismele genei *GSTT1*(alela nulă T1)

Prelucrarea statistică a datelor a fost redată în detaliu în subcapitolul 2.3.

### 2.4. Concluzii

- Analiza polimorfismului ***GSTM1*** a relevat o frecvență de 23,5% pentru genotipul *GSTM1* nul în populația studiată, mai mică cu mai mult de jumătate față de valoarea raportată în literatură la caucazieni. Analiza comparativă nu a relevat o legătură semnificativă între statusul de purtător al alelei nule *GSTM1* și riscul de a dezvolta GPUD ( $p > 0,05$ ). Analiza comparativă pe sexe a identificat o tendință de asociere a femeilor purtătoare a genotipului nul cu GPUD ( $p = 0,054$ , OR:0,529, 95%IC: 0,280-1,002). *GSTM1* nul ar putea fi un factor de risc pentru apariția la femei.
- Analiza polimorfismului ***GSTT1*** a relevat o frecvență de 50,7% pentru genotipul *GSTT1* nul în populația studiată, dublă față de cea raportată la caucazieni. Analiza comparativă nu a relevat o legătură semnificativă între statusul de purtător al alelei nule *GSTT1* și riscul de a dezvolta GPUD ( $p > 0,05$ ). Analiza comparativă stratificată în funcție de sex nu a condus la rezultatele statistice semnificative.
- Analiza genotipului **dublu nul** al polimorfismelor ***GSTM1***, ***GSTT1*** a semnalat o frecvență de 10,9% în populația studiată, similară celei raportate la caucazieni. În urma analizei comparative, nu s-a putut identifica o legătură statistic semnificativă între statutul de purtător și riscul de a dezvolta GPUD ( $p > 0,05$ ). Analiza comparativă, stratificată în funcție de sex nu a condus de asemenea la rezultate statistice semnificative.
- Analiza comparativă a distribuției genotipurilor *GSTM1*, *GSTT1* în lotul pacienților în funcție de prezența factorilor de risc/prognostic amintiți anterior (istoricul familial pozitiv de glaucom, factorii de risc extraoculari, tratamentul chirurgical al glaucomului în antecedente) nu a identificat diferențe semnificative între pacienții care prezentau acești factori și cei la care acești factori erau absenți. ( $p > 0,05$ ).
- Evaluarea prin regresie logistică ordinală univariată a impactului polimorfismelor *GSTM1*, *GSTT1* asupra stadiului GPUD, a identificat prezența unui risc de 3,6 ori mai mare la purtătorii

genotipului GSTM1 nul față de purtătorii genotipului sălbatic ( $p=0,002$ , OR:3,36, 95%IC:1,45-7,77).

- Evaluarea impactului combinațiilor genotipice ale GSTM1, GSTT1 asupra riscului de a dezvolta o formă moderată sau avansată a bolii a identificat prezența unui risc de 2 ori mai mare la purtătorii genotipului dublu nul (GSTM1 nul-GSTT1 nul) față de purtătorii genotipului GSTM1 pozitiv-GSTT1 pozitiv ( $p=0,003$ , OR:2,14, 95%IC:0,70-6,49). Genotipul dublu nul ar putea fi un factor de risc pentru formele moderate sau avansate ale bolii.
- În cadrul evaluării prin regresie logistică multinomială univariată a potențialilor predictorii pentru formele moderate și avansate ale bolii, doar doi dintre factorii considerați: genotipul GSTM1 nul ( $p=0,003$ ) și durata bolii peste 10 ani ( $p=0,011$ ) au avut o relație de dependență semnificativă statistic cu gradul de severitate al glaucomului.
- În cadrul modelului logistic final pentru glaucomul moderat doar genotipul GSTM1 nul a rămas factor de risc independent al ( $p=0,002$ , OR:9,17, 95%IC: 2,23-37,61).
- În cadrul modelului logistic final pentru glaucomul avansat, doar genotipul bolii peste 10 ani a rămas factor de risc independent al ( $p=0,02$ , OR:2,37, 95%IC:1,17-4,78), în timp ce genotipul GSTM1 nul a avut un efect pozitiv asupra riscului de glaucom sever, însă doar cu tendința spre semnificație statistică ( $p=0,063$ , OR:2,65, 95%IC:0,95-7,39).

### 3. Studiul 2- Influența polimorfismului rs991967 asupra glaucomului primitiv cu unghi deschis

#### 3.1. Introducere

Concentrațiile crescute ale TGF- $\beta_2$  observate la nivelul UA și al PNO, au justificat cercetarea acestuia ca factor etiopatogenetic în glaucom. Inițial, Wordinger et al. a cercetat sensibilitatea țesutului trabecular la concentrațiile ridicate de TGF- $\beta_2$  din UA și a descoperit expresia crescută a ARNm corespunzător receptorilor TGF- $\beta$  în culturile celulelor trabeculare umane sănatoase și glaucomatoase. Ulterior, studii animale, in vivo și in vitro au demonstrat creșterea PIO și alterarea drenajului UA în urma administrării de TGF- $\beta_2$  sau transferului genic adenoviral de *TGFB1* sau *TGFB2* la rozătoare. Aceste studii susțin implicarea TGF- $\beta_2$  în creșterea PIO, negând posibilitatea ca valorile crescute din UA al pacienților cu glaucom să fie secundare PIO crescute. Ulterior, s-a descoperit mecanismul creșterii PIO: dereglarea metabolismului matricii extracelulare. Concentrațiile crescute din UA au fost asociate cu stimularea proceselor de sinteză ale MEC și cu inhibiția sistemelor de degradare ale MEC, cu favorizarea depunerii și polimerizării colagenului, fibronectinei și a altor proteine matriceale la nivel trabecular; cu alterarea fenotipului celulelor trabeculare care scad ca număr, își modifică secreția proteică și dobândesc proprietăți contractile. Toate acestea amplifică rezistența trabeculară la drenajul umorului apos determinând creșterea PIO. La nivelul PNO, sinteza crescută de TGF- $\beta_2$  pe seama astrocitelor papilare reactive a fost asociată cu prezența unor modificări matriceale extrem de similare celor trabeculare; cu degenerarea progresivă a axonilor CGR, cu deformare PNO și apariția excavației glaucomatoase a nervului optic. La nivelul RT și al PNO, există o inhibiție atât a mecanismelor de control ale TGF- $\beta_2$  cât și a celor de degradare a matricii extracelulare, care permite exacerbarea concentrațiilor și efectelor acestuia. În ciuda studiilor efectuate, nu s-au evidențiat cauzele expresiei crescute de TGF- $\beta_2$ . Foarte puține studii au cercetat implicarea polimorfismelor TGF- $\beta_2$  în glaucom, cele mai multe fiind orientate spre efectul profibrotic al acestora, incriminat de cicatrizarea bulei de filtrare post trabeculectomie.

În studiul de față, utilizând tehnici moleculare și metode statistice, am dorit să stabilesc frecvența polimorfismului TGF- $\beta_2$  într-un grup de pacienți români cu GPUD. De asemenea am evaluat posibila asociere a acestuia cu patologia amintită. Polimorfismul ales este localizat în regiune 3'-UTR a *TGFB2*, cunoscut fiind faptul că variantele genice cu această localizare pot influența translația și stabilitate genei.

#### 3.2. Obiective

##### Obiective principal

- Genotiparea polimorfismului *TGFB2* rs991967 ;

- Evaluarea asocierii dintre GPUD și genotipurile polimorfismului *TGFB2* rs991967;
- Evaluarea asocierii dintre GPUD și genotipurile polimorfismului rs991967 în funcție de sex ;
- Evaluarea asocierii dintre GPUD și ale polimorfismului rs991967 folosind modelele dominant și recesiv definite pe acesta;
- Evaluarea asocierii dintre GPUD și polimorfismul *TGFB2* rs991967 separat la pacienții de sex feminin și masculin, folosind modelele dominant și recesive ale polimorfismului;
- Analiza asocierii dintre polimorfismul *TGFB2*rs991967 și prezența istoricului familial de glaucom, a factorilor de risc extraoculari și a tratamentului chirurgical al glaucomului în antecedente în funcție de genotip ;
- Analiza asocierii dintre polimorfismul *TGFB2*rs991967 și prezența istoricului familial de glaucom, a factorilor de risc extraoculari și a tratamentului chirurgical al glaucomului în antecedente folosind modelele dominant și recesiv definite;
- Evaluarea asocierii dintre polimorfismul *TGFB2* rs991967 și stadiul de glaucom în funcție de genotip și de modelele dominant, respectiv recesiv;
- Evaluarea asocierii dintre polimorfismul *TGFB2* rs991967 și stadiul de glaucom folosind modelele dominant, respectiv recesiv definite;

#### **Obiective secundare**

- Adaptarea și implementarea în practica medicală a protocoalelor de lucru pentru analiza polimorfismului *TGFB2* rs991967;
- Completarea datelor lipsă privind frecvența alelelor și a genotipurilor studiate în populația din Transilvania, datele existente la momentul actual fiind puține sau inexistente chiar;

### **3.3. Material și metodă**

Studiul de față s-a desfășurat sub forma unui studiu caz-martor și a inclus cele două loturi descrise în detaliu în subcapitolul **2.1**. Genotiparea polimorfismului rs991967 a necesitat tehnici de genetică moleculară de tipul PCR-RFLP. Au fost genotipate: alela comună C (wild-type) și alela variant (variant) A ale polimorfismului studiat. Analiza statistică a datelor a fost descrisă în subcapitolul **2.3**.

### **3.4. Concluzii**

- Analiza polimorfismului *TGFB2* **rs991967** a identificat o frecvență a alelei A de 31,33% în populația studiată, mai mică ca cea raportată în cadrul unui studiu efectuat în populația chineză. Conform analizei comparative, purtătorii alelei variant A nu au prezentat un risk crescut de apariție a GPUD ( $p > 0,05$ );
- Analiza asocierii polimorfismului *TGFB2* rs991967 cu GPUD în funcție de genotip sau de modele ipotetice dominant și recesiv nu a relevat o asociere semnificativă între acestea și apariția GPUD ( $p > 0,05$ ); La straticarea în funcție de sex nu au fost evidențiate diferențe în privința asocierii dintre genotipurile polimorfismului și boală.
- Analiza asocierii dintre genotipurile polimorfismului *TGFB2* rs991967 și prezența factorilor de risc/prognostic amintiți anterior, a relevat asocierea statistic semnificativă a purtătorilor genotipurilor AC sau AA cu prezența unui istoric familial pozitiv de glaucom ( $p = 0,036$ , genotip AC OR:3,16 95%CI: 1,24-8,06, genotip AA OR:3,05 95%CI:0,67-13,96).
- Analiza asocierii dintre modelul dominant al polimorfismului *TGFB2* rs991967 și prezența factorilor de risc/prognostic amintiți, a relevat asocierea statistic semnificativă a acestora cu prezența unui istoric familial pozitiv de glaucom (AC+AA vs. CC  $p = 0,013$ , OR:3,22, 95%IC:1,26-8,33).
- Analiza asocierii dintre genotipurile polimorfismului *TGFB2* rs991967 și stadiul de glaucom nu a identificat o legătură statistică semnificativă între purtătorii genotipurilor AC sau AA și stadiul de glaucom ( $p > 0,05$ ).



- Analiza asocierii dintre modele dominant, respectiv recesiv ale polimorfismului *TGFB2* rs991967 și stadiul de glaucom nu a identificat o legătură statistică semnificativă între acestea și stadiul de glaucom ( $p > 0,05$ ).

#### **4. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

În contextul creșterii dramatice a numărului bolnavilor cu glaucom primitiv cu unghi deschis estimat să atingă aproape 80 de milioane până în anul 2040, al recunoașterii potențialului orbitor al acestei afecțiuni, al lipsei unor strategii de screening precoce și al unor tratamente eficiente patogenetice, studiul etiopatogeniei Glaucomului Primitiv cu Unghi Deschis, constituie un subiect de actualitate, mai ales din perspectiva posibilei aplicabilității a cunoștințelor în practica investigării și/sau a terapiei antiglaucomatoase.

Informațiile prezentate în lucrare, reprezintă primele date despre aceste variante genice și glaucomul primitiv cu unghi deschis în populația din țara noastră. Nici una din variantele investigate nu a fost analizată în legătură cu GPUD în populația din România. Mai mult decât atât, am găsit un singur studiu în literatură care să evalueze asocierea polimorfismelor *TGFB2* cu GPUD în populația. Totodată, nu există date publicate care să fi studiat asocierea acestor polimorfisme cu alți factori de risc ai glaucomului sau cu diferitele grade de severitate ale acestuia.

Rezultatele studiului oferă primele date referitoare la implicarea polimorfismelor investigate în etiopatogenia GPUD, la asocierea acestora cu alți factori de risc și impactul asupra evoluției bolii. Totodată, frecvența alelelor și a genotipurilor pot servi ca punct de plecare în evaluarea distribuției acestora în populația din România, demers util pentru viitoarele studii care vor aprofunda aceste polimorfisme.

**„IULIU HAȚIEGANU”  
UNIVERSITY of GENERAL MEDICINE and PHARMACY  
CLUJ-NAPOCA  
DOCTORAL THESIS**

**„Genetic determinism of Primary Open Angle Glaucoma”  
-SUMMARY-**

Phd Student  
**Anda-Maria Șter**

Scientific Coordinator  
**Prof.dr. Victor Ioan Pop**

**TABLE OF CONTENTS**

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	15
<b>1. Primary open angle glaucoma</b>	17
1.1. Overview	17
1.2 Risk factors	19
<b>2. Molecular biology of primary open angle glaucoma</b>	23
2.1. Intraocular pressure and vascular insufficiency	26
2.2. Genetic variants of causative genes	26
2.3. Genetic variants of associated genes	31
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	41
<b>1. Working hypothesis/Objectives</b>	43
<b>2. General methodology of research</b>	45
<b>2.1. The studied population</b>	45
<b>2.2. Molecular analysis of DNA</b>	47
2.2.1. Genomic DNA isolation and purification	47
2.2.2. PCR-RFLP technique	49
2.2.2.1. DNA fragments amplification (PCR)	50
2.2.2.2. DNA digestion with restriction enzymes	51
2.2.2.3. DNA fragments separation	52
2.2.2.4 DNA fragments detection	52
<b>2.3. Statistical analysis</b>	53
<b>3. Studiul 1- The role of GSTM1, GSTT1 polymorphisms in primary open angle glaucoma</b>	55
<b>3.1. Introduction</b>	55
<b>3.2. Objectives</b>	56
<b>3.6. Material and methods</b>	57
3.3.1. The studied population	57
3.3.2. Analysed genic variants	58
3.3.3. Statistical analysis	58
3.3.4. Molecular methods of genotyping	58
<b>3.7. Results</b>	60
<b>3.8. Discussions</b>	68
<b>4. Studiul 2- TGFB2 rs991967 polymorphism in primary open angle glaucoma</b>	75

<b>4.1. Introduction</b>	75
<b>4.2. Objectives</b>	77
<b>4.3. Material and methods</b>	77
4.3.1. The studied population	77
4.3.2. Analysed genetic variants	77
4.3.3. Statistical analysis	78
4.3.4. Molecular methods of genotyping	78
<b>4.4. Results</b>	80
<b>4.5. Discussions</b>	86
<b>5. General conclusions</b>	91
<b>6. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	95
<b>REFERENCES</b>	97
<b>ABBREVIATIONS</b>	12

**Keywords:** primary open angle glaucoma, genetic polymorphisms, GST, TGF- $\beta_2$

## **Current state of knowledge**

The five senses are priceless gifts which empower men to discover the surrounding universe by means of colour, light, sound, taste, touch and scent. Among them, sight is one of the most complex, with enormous influence of a man's perception of his outside and inner world.

Losing sight draws dramatic consequences. At the moment, glaucoma is the leading cause of irreversible blindness in the world. In 2002 the estimated number of blind people due to glaucoma was about 4,5 million worldwide. These numbers are expected to rise up to 11 million cases in 2020. At the same time, the number of glaucoma patients in the world will dramatically increase by 18,3% to 76 million in 2020. Most of these cases would be attributable to primary open angle glaucoma (POAG), the most common type of glaucoma. The risk of losing sight due to POAG depends highly on the moment of diagnosis, patient compliance to treatment, careful and accurate follow up and continuous adjustment of therapy according to the patient's individual needs.

POAG represents a group of chronic optic neuropathies characterized by specific structural changes of the optic nerve head (ONH) and nerve fiber layer (RNFL), in absence of other ocular diseases and congenital abnormalities. These changes are caused by the progressive loss of retinal ganglion cells and determine gradual and irreversible visual field loss. At the same time, POAG manifests a variable degree of genetic heterogeneity and clinical severity.

POAG has a rather a silent disease course with patients rarely experiencing any complaints. Thus, it is usually discovered in late stages when severe and irreversible optic nerve damage impairs patient's quality of life. These distinct epidemiological and clinical aspects raise the need for developing screening and early diagnosis strategies that would allow an earlier treatment initiation and a better preservation of the nerve fiber layer and quality of life. In order to meet these needs, a better understanding of glaucoma pathogenesis is essential.

Elevated intraocular pressure (IOP) is still the main identified risk factor in POAG and the major target of available glaucoma therapies. However, it should be noted that only one third to half of all glaucoma patients show elevated IOP in early stages. Furthermore, while some of these patients benefit from the currently available glaucoma therapies and result in a positive outcome, others may

experience progressive neuronal loss in spite of lowering their IOP levels. Moreover, there are patients with High Intraocular Pressure who never develop optic nerve damage and glaucoma or patients with POAG whose IOP values are within normal range.

Consequently, while IOP is a major risk factor in relation to glaucoma neuropathy, it is by no means the only factor responsible. Older age, male gender, African-American and Afro-Caribbean races, myopia, pseudoexfoliation, low ocular perfusion pressure and family history of POAG are recognized risk factors for the development of POAG. Extensive investigations including biochemical, histopathological and genetical studies, have failed in revealing a primary cause of glaucoma, but were able to delineate several hypotheses concerning glaucoma pathogenesis: mechanical compression of nerve fiber bundle at the level of lamina cribrosa due to raised IOP; local vascular insufficiency; mutations in specific nuclear genes; increased glutamate levels; alteration in nitric oxide metabolism; changes in mitochondrial genome; toxic effects and oxidative damage caused by reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS). Each of these seems to promote and assist the decay of trabecular meshwork (TM) cells and of retinal ganglion cells (RGC) seen in POAG.

An increased risk of developing POAG was often observed in first degree relatives of POAG patients. This has led to the assumption that genetic factors might play a part in POAG pathogenesis. Several chromosomal loci and "causative genes" have been identified and held responsible for mendelian forms of disease: *MYOC*, *OPTN*, *WDR36*, *NTF4*, *CYP1B1*, *TBK1*. However, most POAG cases are believed to be complex, multifactorial diseases, caused by the interaction between multiple genetic and environmental factors. In such cases, widely applied association studies have identified multiple genes as possible risks factor for POAG. This approach is known as the „candidate gene approach". Investigated genes were selected based on the previously issued pathogenic hypotheses. This paper focuses mainly on complex forms of POAG which are more common in the population.

Oxidative stress has been shown to play a part in multiple diseases, including POAG. Ocular tissues possess valuable antioxidant mechanisms which include Gluthathione S-transferases enzymes (GST). POAG patients seem to experience a deficiency of their local and systemic antioxidant potential, while being exposed to an increased amount of reactive oxygen and nitrogen species due to mitochondrial DNA mutations, local vascular dysregulation, elevated TGF- $\beta_2$  levels in aqueous humor (AH) and ONH. Inability to neutralize these compounds draws unfortunate consequences on the trabecular meshwork, the main site of AH drainage. Drainage pathway resistance to flow increases, causing raised IOP. If these values exceed one's tolerated limits, raised IOP has damaging effects causing the progressive and irreversible loss of RGC. Within this context, the study of GST enzymes has proved of interest, by providing important information on the antioxidant potential in POAG.

Elevated TGF- $\beta_2$  levels in the AH and ONH of POAG patients together with its pro-fibrotic effects described in numerous diseases, have led to the hypothesis that TGF- $\beta_2$  might be responsible for the extracellular matrix (ECM) remodeling observed in POAG. It has the ability to alter trabecular meshwork cells phenotype and number; to promote ECM synthesis while inhibiting ECM degradation in the TM and ONH; to favor lipid peroxidation and ROS production. These cause the impairment of AH drainage and result into raised IOP levels which can trigger RGC lesions and loss. Genic variants of *TGFB2* might explain elevated TGF- $\beta_2$  levels found in POAG patients and their role in POAG pathogenesis.

## **Personal contribution**

### **1. Working hypothesis/Aims**

This paper focuses on complex forms of POAG and aims to investigate genetic factors possibly involved in POAG pathogenesis. Susceptibility to multifactorial diseases depends upon the number of risk alleles inherited from both parents: the bigger the number is, the higher the risk of developing the disease. Nevertheless, environmental factors play a critical part in converting or not vulnerability to disease. The identification of allelic variants that convey disease susceptibility and of specific interactions that validate a certain genotype and thus convert vulnerability to disease would enable the development of adequate measures of prevention and pathogenic treatment.

The studied genic variants were not randomly chosen. GSTs are a family of enzymes which interact with endogenous and xenobiotic substrates by catalyzing their conjugation with reduced glutathione. These are not only involved in detoxifying exogenous electrophilic xenobiotics, but also in inactivating endogenous end products formed as secondary metabolites during oxidative stress. GSTM1, GSTT1 null polymorphisms have been associated with increased oxidative stress damage, cancer, degenerative disease and POAG. In spite of the multiple studies conducted, their role in POAG pathogenesis is still unclear. Elevated TGF- $\beta_2$  levels in the AH and ONH of POAG patients suggest that TGF- $\beta_2$  might be responsible for the degeneration of trabecular meshwork cells and retinal ganglion cells by promoting ECM synthesis and deposition and ROS formation. Thus, taking into account the aforementioned points, in the present study we chose to investigate GSTM1, GSTT1 null polymorphisms and *TGFB2* rs991967 polymorphism as possible risk factors of POAG in a group of Romanian population from Transylvania.

## 2. General Research Methodology

### 2.1. The studied population

This study was conducted an observational, retrospective, randomized case-control study assessing 157 patients with POAG and 137 POAG free patients or healthy controls (control group). All subjects in the control group were free of any cancer or autoimmune disease (that they knew of). Participants were recruited between 2012-2013 from the Ophthalmology Department of Cluj-Napoca Emergency County Hospital, after giving their informed consent. The tenets of the declaration of Helsinki were followed and the protocols for human experimentation and genetic testing were approved by the Ethical Commission of „Iuliu Hațieganu” University of General Medicine and Pharmacy.

All subjects recruited underwent a complete ophthalmological examination. POAG patients had to meet at least two of the following three criteria: (a) IOP above 21mmHg; (b) pathological cupping of the optic disc; (C) a glaucoma hemifield test (GHT) outside normal limits with consistent visual field defects at the same location on two consecutive follow-ups. At the same time, an open anterior chamber angle was mandatory for all POAG patients. All participants presenting cancer, autoimmune disease, congenital glaucoma or secondary forms of glaucoma were excluded from the study.

### 2.2. Molecular Analysis of DNA

Genetic analyses were performed in the Laboratory of Genetics of „Iuliu Hațieganu” University of General Medicine and Pharmacy. For this purpose venous blood samples were obtained from all participants and collected into sterile EDTA vacutainer tubes.

First, DNA extraction was performed using Wizard Genomic DNA Purification Kit. Afterwards, DNA fragments of interest were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). The resulted amplified DNA products were then digested with specific restriction enzymes. DNA fragments were separated by agarose 2% gel electrophoresis and identified.

### 2.3. Statistical analysis

For statistical analysis we used R software environment for statistics computing and graphics version 3.2.1 (rms functions package)

Student t test for independent groups with unequal variances was used for comparing the mean ages in the two groups. Chi-square or Fisher exact tests was used for comparing differences in sex and genotype frequencies between groups and for additional comparisons among glaucoma subgroups. We used odds ratio (OR) and 95% associated confidence intervals to highlight the size of tested associations.

We asked our POAG patients whether or not they had the following risk/prognosis factors: previous family history of POAG; extraocular risk factors like: migraine, cold hands and feet, thyrotopathy, low diastolic pressure, vascular cerebral attack; or preceding surgical treatment for POAG and used Chi-square tests to assess their association with different genotypes.

Chi-square test was also used to determine Hardy-Weinberg (HWE) equilibrium consistency; a statistically significant result would indicate the absence of HWE in the studied population.

We then classified individuals according to MD severity scale and used Chi-square test to evaluate the association of different genotypes with POAG defined by three stages: early, moderate and advanced glaucoma.

Binary logistic regression was used to determine independent risk factors of POAG. Univariate ordinal and multinomial logistic regression were performed to assess dependences between demographic and clinical factors and glaucoma stage classified as: incipient, moderate and advanced. Odds ratios with 95% associated confidence intervals (CIs) were determined as indices of strength of the polymorphism's association with moderate and advanced glaucoma. Possible predictors of glaucoma stage were first separately assessed. The multivariable model was defined considering all independent variables whose estimated significance level in univariate multinomial logistic regression was  $p < 0.25$ . In the second part of the logistic regression, several additive imbricated models were tested and compared by Chi-square test (Likelihood Ratio Test) or indices like Bayesian Information Criterion (BIC) and Akaike Information Criterion (AIC).

The level of significance in the multivariable logistic models and all two-sided tests was  $\alpha = 0.05$ . Statistical significance was given by an estimated significance level,  $p < 0.05$ .

### **3. Study 1- The role OF GSTM1, GSTT1 polymorphisms in primary open angle glaucoma**

#### **3.1. Introduction**

The involvement of reactive oxygen species has been documented in a wide variety of diseases, including POAG. Ocular tissues have important antioxidant mechanisms, Gluthathione S-transferases being among the most valuable. However, POAG patients seem to experience a local and systemic deficiency in their antioxidant potential, while being exposed to an increased production of reactive oxygen and nitrogen species. Their inability to neutralize such toxic compounds has deleterious consequences on trabecular meshwork cells and retinal ganglion cells which lead to increased IOP values with the progressive alteration and loss of retinal ganglion cells.

#### **3.2. Objectives**

##### **Primary Objectives**

- Genotyping GSTM1, GSTT1 polymorphisms;
- Evaluate the association between POAG and GSTM1 null, GSTT1 null genotypes;
- Evaluate the association between POAG and GSTM1 null, GSTT1 null genotypes by gender;
- Evaluate the association between POAG and GSTM1-GSTT1 associated polymorphisms;
- Evaluate the association between POAG and GSTM1-GSTT1 associated polymorphisms by gender;
- Comparative analysis of GSTM1, GSTT1 null genotypes in POAG patients according to glaucoma family history, extra-ocular risk factors and previous surgical treatment;
- Evaluate the association between GSTM1, GSTT1 polymorphisms, GSTM1-GSTT1 associated polymorphisms and glaucoma stage;
- Evaluate the individual effect of GSTM1, GSTT1 polymorphisms, GSTM1-GSTT1 associated polymorphisms on POAG;
- Evaluate the individual effect of GSTM1, GSTT1 polymorphisms, GSTM1-GSTT1 associated polymorphisms on POAG stage;
- Evaluate the adjusted effect of GSTM1, GSTT1 polymorphisms, GSTM1-GSTT1 associated polymorphisms on POAG stage; adjustments were made for possible confounding variables: glaucoma family history, extra-ocular risk factors and disease duration greater than 10 years;

##### **Secondary objectives**

- Adapt and implement working protocols for genotyping GSTM1, GSTT1 polymorphisms;
- To provide lacking information concerning the frequency and distribution of the studied polymorphisms in Transylvania, Romania;

### 3.3. Material and method

This study was conducted as an observational, retrospective, case-control study and included 294 participants. The study group consisted of 157 POAG patients, while the control group had 137 POAG free patients or healthy controls. All of them had been recruited after giving their informed consent, from the Ophthalmology Department of Cluj Emergency County Hospital.

GSTM1, GSTT1 polymorphisms were investigated due to their role in protecting ocular tissues from ROS and RNS. An adapted PCR-multiplex protocol was used to genotype GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. The used protocol easily identifies the GSTT1 and GSTM1 homozygous null genotypes but cannot distinguish between GSTM1 and GSTT1 homozygous and heterozygous positive genotypes.

Statistical analysis was performed as described in chapter 1.3.

### 3.4. Conclusions

- GSTM1 null polymorphism encountered a frequency of 23% in the studied population, which was two times lower than previously reported frequencies in Caucasians. Statistical analysis revealed no significant differences in the distribution of GSTM1 null genotypes among the two groups ( $p > 0,05$ ). However, when stratified by sex, women presenting GSTM1 null were almost significantly associated with glaucoma ( $p = 0,054$ , OR: 0,529, 95%IC: 0,280-1,002). GSTM1 null polymorphisms might be a risk factor for POAG in women.
- GSTT1 null polymorphism was present in 50,7% of the studied population, which was two times higher than previously reported frequencies in Caucasians. No significant differences were found between GSTT1 null genotypes distribution in the two groups ( $p > 0,05$ ). Furthermore, gender did not influence these results.
- The double null genotype GSTM1-GSTT1 reached a frequency of 10,9% in the studied population, similar to previously reported values in Caucasians. Carriers of the double null genotype GSTM1-GSTT1 were not associated with an increased risk of developing POAG ( $p > 0,05$ ).
- Comparative analysis of GSTM1, GSTT1 null genotypes distributions in POAG patients according to glaucoma family history, extra-ocular risk factors and previous surgical treatment revealed no statistically significant differences ( $p > 0,05$ ).
- We evaluated association between GSTM1, GSTT1 polymorphisms and glaucoma stage and found that GSTM1 null carriers had a higher risk of developing a moderate or advanced disease as compared to wild type genotype carrier patients ( $p = 0,002$ , OR=3.362, 95% CI: 1.45-7.77).
- We evaluated association between GSTM1-GSTT1 associated polymorphisms and glaucoma stage and found that double null genotype (GSTM1 null-GSTT1 null) carriers had an increased risk of developing a moderate or advanced form of disease as compared to GSTM1 pozitiv-GSTT1 pozitiv carrier patients ( $p = 0,003$ , OR:2,14, 95%IC:0,70-6,49). The double null genotype might be a risk factor for moderate or severe forms of POAG.
- When univariate multinomial logistic regression was used to evaluate the adjusted effects of GSTM1, GSTT1 polymorphisms on moderate and advanced disease, only two of the considered predictors were significantly associated with glaucoma severity: GSTM1 null ( $p = 0,003$ ) and disease duration greater than 10 years ( $p = 0,011$ ).
- In the final logistic model for moderate glaucoma, only GSTM1 null genotype was an independent risk factor for moderate POAG ( $p = 0,002$ , OR:9,17, 95%IC: 2,23-37,61).
- In the final logistic model for advanced glaucoma, only disease duration greater than 10 years was an independent risk factor, while GSTM1 null genotype had a weaker impact with a trend towards statistical significance ( $p = 0,10$ , OR=2,48, 95% CI: 0,84-7,3).

## 4. Study 2 – Influence of *TGFB2* rs991967 polymorphism on POAG

### 4.1. Introduction

Elevated TGF- $\beta_2$  levels in the AH and ONH of POAG patients suggested that TGF- $\beta_2$  might be involved in POAG pathogenesis. Wordinger et al found that TGF- $\beta_2$  receptors were expressed in trabecular meshwork cells of healthy controls and glaucoma patients, rendering this tissue sensitive to TGF- $\beta_2$  levels found in the AH. Following ex vivo and in vitro studies indicated that TGF- $\beta_2$  could be responsible for the increase in IOP values, often observed in POAG by altering ECM equilibrium. Raised AH levels were associated with pronounced ECM synthesis and deposition and decreased degradation, with the alteration of trabecular meshwork cells number and phenotype. All of these lead to an increased resistance to AH drainage outflow and impaired IOP values. At the ONH, reactive astrocytes are responsible for the elevated TGF- $\beta_2$  levels found in POAG patients. These are associated with similar extracellular matrix remodelling processes as the ones previously described and can lead to the progressive loss of RGC with specific changes in ONH structure and appearance. Normally, numerous signalling molecules counteract TGF- $\beta_2$ 's actions on TM and ONH, or abolish its activity altogether: bone morphogenetic proteins 4 and 7 (BMP4, BMP7) prevent ECM deposition and antagonize its pro-fibrotic effects in TM and ONH; matrix metalloproteinases (MMPs) are major degrading enzymes of ECM. However, in POAG signalling of these TGF- $\beta_2$  antagonists seems abolished, making it possible for the excessively expressed TGF- $\beta_2$  to further exacerbate its effects and thus promote increased IOP values and ONH degeneration. In spite of the great amount of research put into exploring TGF- $\beta_2$  in POAG, little is known about what causes the increase in TGF- $\beta_2$  levels. These could be due to genetic variants in *TGFB2*, but so far genetic studies have mainly focused on the involvement of these polymorphisms in scarring and fibrosis following glaucoma surgery.

Taking into account all of the above, in this study we aimed to assess the influence of *TGFB2* rs991967 polymorphism on POAG in a group of Romanian patients from Transylvania. By using molecular and statistical analysis we wished to determine the frequency of *TGFB2* rs991967 polymorphism in the studied population. The chosen polymorphism is located in the 3'-UTR region of *TGFB2* and thus might influence gene translation and stability.

### 4.2. Objectives

#### Primary Objectives

- Genotyping *TGFB2* rs991967 polymorphism;
- Evaluate the association between POAG and *TGFB2* rs991967 polymorphism genotypes;
- Evaluate the association between POAG and *TGFB2* rs991967 polymorphism genotypes according to gender;
- Evaluate the association between POAG and *TGFB2* rs991967 polymorphism by dominant and recessive models;
- Evaluate the association between POAG and *TGFB2* rs991967 polymorphism by dominant and recessive models according to gender;
- Evaluate the association between POAG and glaucoma family history, extra-ocular risk factors and previous surgical treatment according to *TGFB2* rs991967 polymorphism genotypes;
- Evaluate the association between POAG and glaucoma family history, extra-ocular risk factors and previous surgical treatment according to *TGFB2* rs991967 polymorphism dominant and recessive models;
- Evaluate the association between *TGFB2* rs991967 polymorphism and POAG stage according to genotype;
- Evaluate the association between *TGFB2* rs991967 polymorphism and POAG stage according to dominant and recessive models;

#### Secondary objectives

- Adapt and implement working protocol for genotyping *TGFB2* rs991967 polymorphism;



- To provide lacking information concerning the frequency and distribution of the studied polymorphisms in Transylvania, Romania

### 4.3. Material and method

This study was conducted as an observational, retrospective, case-control study and included 294 participants. The study group consisted of 157 POAG patients, while the control group had 137 POAG free patients or healthy controls. All of them had been recruited after giving their informed consent, from the Ophthalmology Department of Cluj Emergency County Hospital. Additional details concerning the studied population were given in chapter 2.1.

An adapted PCR-RFLP protocol was used for A>C mutation of 3' UTR region of *TGFB2* genotyping. After DNA was extracted with commercial kits, targeted PCR was performed. Amplified DNA products were digested with 5 units of HpyCH4III enzyme, resulting in 2 different fragments, one of 139 bp and 100 bp respectively. Three genotypes were identified, homozygous wild type CC (139 bp and 100bp), heterozygous AC (239, 139 and 100 bp) and homozygous variant AA(239bp).

Statistical analysis was performed as described in chapter 2.3. To evaluate the association of rs991967 polymorphism with POAG based on genotype frequency we compared patients and controls. First, we assessed the risk associated with AC, respectively AA genotype carriers versus CC genotype carriers by univariate binary logistic regression. Afterwards, the following two hypothetical models: the dominant model in which risk is attributed to both heterozygous and homozygous for the variant allele and the recessive model in which risk is attributed only to homozygous genotypes of the variant allele, were used for comparative analysis.

The association of the studied polymorphism and glaucoma severity or the aforementioned risk/prognostic factors (previous family history, extra-ocular risk factors and previous surgical treatment) was first evaluated for AC, respectively AA genotype carriers versus CC genotype carriers and then for the two hypothetical models. If results were to be insignificant or  $p > 0,25$ , we would not perform multivariate analysis for other possible predictors of glaucoma stage.

### 4.4. Conclusions

- *TGFB2* rs991967 polymorphism analysis revealed a frequency of 31,33% for variant allele A in the studied population, lower than the one reported in a previous Chinese study. Comparative analysis revealed no statistically significant risk for POAG in carriers of the variant allele A ( $p > 0,05$ ).
- We evaluated the association between *TGFB2* rs991967 polymorphism and POAG according to genotype, but found no statistically significant differences between AC or AA genotype carriers and CC carriers ( $p > 0,05$ ). Additional stratification according to gender did not reveal significant differences among men and women regarding the association between rs991967 genotypes and POAG.
- We evaluated the association between *TGFB2* rs991967 polymorphism and POAG according to hypothetical dominant and recessive models, but found no statistically significant differences between AC+AA genotype carriers and CC genotype carriers, respectively AA genotype carriers versus AC+CC genotype carriers ( $p > 0,05$ ). Additional stratification according to gender did not reveal significant differences among men and women regarding the association between *TGFB2* rs991967 polymorphism hypothetical models and POAG.
- The analysis of association between *TGFB2* rs991967 polymorphism and the aforementioned risk/prognostic factors according to genotype showed that AC and AA genotype carriers were more frequently associated with the presence of a positive family history of glaucoma ( $p = 0,036$ , AC genotype OR:3,16 95%CI: 1,24-8,06, AA genotype OR:3,36 95%CI:0,67-13,96).
- The analysis of association between *TGFB2* rs991967 polymorphism dominant model and the aforementioned risk/prognostic factors according, showed a statistically significant association with the presence of positive a family history of glaucoma (AC+AA vs. CC  $p = 0,013$ , OR:3,22, 95%CI:1,26-8,33);

- We evaluated the association between *TGFB2* rs991967 polymorphism and glaucoma stage according to genotype, but found no statistically significant difference between AC or AA genotype carriers and CC genotype carriers ( $p=0.05$ ).
- We evaluated the association between *TGFB2* rs991967 polymorphism and glaucoma stage according to the hypothetical dominant and recessive models, but none of the models significantly influenced glaucoma stage ( $p>0.05$ ).

## 5. Originality and innovative contributions of the thesis

Glaucoma pathogenesis is an area of great interest due to the ever increasing number of POAG patients worldwide, threatening blinding potential, lack of adequate screening and early diagnosis strategies and of efficient pathogenic treatment.

This is the first study to investigate *GSTM1*, *GSTT1* and rs991957 polymorphisms in POAG patients from Transylvania, Romania. While *GSTM1*, *GSTT1* polymorphisms had been previously studied in POAG patients of different origins with inconclusive results, to our knowledge, this is the second study to investigate the association of *TGFB2* and POAG.

We thought these genic variants might be influenced by glaucoma severity. Thus, we classified patients according to disease stage in incipient, moderate and advanced glaucoma and assessed the effect of genetic and non-genetic factors on the risk of developing moderate or advanced glaucoma. In the available literature we found no other study to assess the role of these genic variants in POAG according to disease severity.

As we focused on multifactorial forms of POAG, we considered important investigating possible associations between genetic and non-genetic risk factors in POAG patients, but found no other similar study in the literature.

The scientific and statistical results presented in this thesis represent the first data regarding the role of the studied polymorphisms in POAG patients from Transylvania, Romania, their association with glaucoma stage and non-genetic risk factors. The allele and genotype frequencies presented can be used as a starting point in future studies evaluating the distribution of these polymorphisms in the Romanian population.