

УДК 617.7-007.681-021.3-021.3:576

## Розподіл поліморфних генотипів гену глутатіон-S-трансферази (GSTP1, GSTM1 і GSTT1) та їх асоціативний зв'язок з первинною відкритокутовою глаукомою

С. О. Риков<sup>1</sup>, д-р мед. наук, професор; А. В. Бурдей<sup>1</sup>, аспірант, лікар-офтальмолог,  
С. В. Зяблицев<sup>2</sup>, д-р мед. наук, професор; С. Ю. Могілевський<sup>1</sup>, д-р мед. наук, професор

<sup>1</sup> Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика; Київ (Україна)

<sup>2</sup> Національний медичний університет імені О.О. Богомольця Київ (Україна)

E-mail: eye-bolit@ukr.net

**Вступ.** На сучасному етапі підтверджено роль генетичних факторів в розвитку первинної відкритокутової глаукоми (ПВКГ). В патогенезі ПВКГ одним із важливих механізмів є активація окисного стресу із зниженням активності ферментів сімейства глутатіон-S-трансферази (GST). Враховуючи суттєві відмінності частоти поліморфізмів гену GST в різних популяціях та суперечливі дані щодо асоціативних зв'язків із ПВКГ, доцільно було провести такі дослідження у хворих з української популяції.

**Мета** дослідження – визначення частоти розподілу поліморфних генотипів гену GST (GSTP1, GSTM1 і GSTT1) та їх асоціації з розвитком та прогресуванням ПВКГ.

**Матеріал та методи.** У дослідженні прийняли участь 172 хворих з ПВКГ I-IV стадій та 98 добровольців без такого діагнозу, які склали контрольну групу. Всі пацієнти з ПВКГ були розподілені на 4 групи відповідно до стадії глаукоми за А.П. Нестеровим (2008): 1 групу склали 38 пацієнтів з I (початковою) стадією, 2 групу – 44 пацієнта з II (розвинутою) стадією, 3 групу – 40 пацієнтів з III (з подальшим прогресуванням та звуженням полів зору) стадією та 4 групу – 50 пацієнтів з IV (термінальною) стадією і розвитком сліпоты. Дослідження поліморфізму генів здійснювали з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США) методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Для статистичного аналізу результатів дослідження використовували пакет MedStat і MedCalc v.15.1 (MedCalc Software bvba).

**Результати.** Виявлено 11 комбінацій генетичних варіантів, частота яких мала значущі відмінності як між контролем та групами хворих на ПВКГ, так і між самими групами пацієнтів ( $\chi^2=112,63$ ;  $p=0,00E-01$ ). Вірогідні відмінності частот виявлені між контрольною групою та всіма групами хворих з ПВКГ ( $\chi^2=54,68$ ,  $p=0,00E-01$ ). Частота генетичних поліморфізмів відрізнялася за двобічним критерієм Фішера між контрольною та I ( $p(\chi^2)=0,001$ ), 2 ( $p(\chi^2)=0,003$ ), 3 та 4 групами ( $p(\chi^2)=0,00E-01$ ). Наявність генотипу GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+ збільшувала ризик розвитку I стадії ПВКГ у 15 разів. Генотип GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null був пов'язаний із прогресією захворювання (для носіїв цього генотипу ризик розвитку ПВКГ II стадії був у 5,1 рази, III стадії – у 6,6 рази та IV стадії – у 13 разів більшим у порівнянні з контролем). Наявність предкового генотипу GSTP1(Ile/Ile) у сполученні хоча б з одним повноцінним (не нульовим) варіантом генів GSTM1 або GSTT1 мало протективний ефект у відношенні до прогресування ПВКГ.

**Висновки.** Поліморфні генотипи генів глутатіон-S-трансферази (GSTP1, GSTM1 і GSTT1), які призводять до зниження антиоксидантної активності, відіграють суттєву роль як у виникненні, так і у прогресуванні ПВКГ. При цьому, патологічне значення мало поєднання двох мутантних «нульових» алелей (GSTM1-null та GSTT1-null). Сполучення предкового генотипу GSTP1(Ile/Ile) з обома або хоча б з одним повноцінним варіантом (GSTM1+ або GSTT1+) мало протективний ефект.

### Ключові слова:

первинна відкритокутова глаукома, гени глутатіон-S-трансферази, GSTP1, GSTM1, GSTT1

**Вступ.** Глаукома характеризується не тільки збільшенням внутрішньоочного тиску, але й загибеллю клітин сітківки та дегенеративними процесами в зоровому нерві [13]. Глаукома призводить до сліпоти і є соціально значимою проблемою всесвітнього масштабу [11]. На сучасному етапі роль генетичних факторів в розвитку глаукоматозного процесу підтверджена рядом досліджень [2]. Близько 5% всіх епізодів первинної відкритокутової глаукоми (ПВКГ) можна віднести до моногенних форм глаукоми, переважно це випадки, що пов'язані з мутацією гену міоциліну [9]. Але переважна більшість захворювань на ПВКГ пов'язана зі спільними ефектами декількох генів та факторів ризику [4, 5, 9].

Ферменти суперсімейства глутатіон-S-трансферази (GST) приймають активну участь у механізмах знешкодження цитотоксичних речовин шляхом декількох реакцій: 1) некаталітичний зв'язок з ксенобіотиками; 2) каталітичний зв'язок ксенобіотиків з глутатіоном; 3) відновлення активності глутатіонпероксидази [3, 8]. Глутатіон-S-трансферазна активність знаходиться під впливом декількох генів, зокрема GSTP1, GSTM1 та GSTT1. Ген GSTP1 розташований на 11-й хромосомі, GSTM1 – на 1-й і GSTT1 – на 22-й. Ген GSTP1 має три алельних варіанти, що пов'язані із заміною нуклеотиду аденіну на гуанін та, як наслідок, заміною амінокислотної послідовності: ізолейцин в положенні 105 білку змінюється на валін – GSTP1(Ile/Ile), GSTP1(Ile/Val) та GSTP1(Val/Val) [13]. Поліморфізм генів GSTM1 та GSTT1, пов'язаний з відсутністю (GSTM1+ та GSTT1+) чи наявністю (GSTM1-null та GSTT1-null) делецій, так звані «нульові» генотипи [12]. Крім вищезазначених властивостей щодо детоксикації ксенобіотиків, GSTP1 приймає участь в механізмах проліферації та загибелі клітин через регуляцію протеїнкіназ, зокрема c-Jun N-terminal kinases [8]. Зміна амінокислотної послідовності призводить до синтезу ферменту зі зниженою активністю [12]. Нами раніше вже було показано вплив делеційних поліморфізмів генів GST (GSTM1 та GSTT1) на розвиток та прогресування ПВКГ у хворих з української популяції [7].

В патогенезі ПВКГ одним із важливих механізмів є активація окислювального стресу [10], що імовірно, зв'язано з поліморфними варіантами генів GST, які призводять до зниження активності ферментів сімейства глутатіон-S-трансферази та розвитку цього захворювання. При мультифакторіальній природі захворювання спадкова схильність обумовлена комбінацією декількох генів, при цьому сполучення різних алельних варіантів може нівелювати патологічний вплив генів, пов'язаних з розвитком захворювання, а може навпаки, його посилювати [8]. Враховуючи суттєві відмінності щодо успадкування поліморфних варіантів генів в різних популяціях та суперечливі дані щодо наявності асоціації з захворюванням, доцільно провести дослідження поліморфізму генів сімейства

глутатіон-S-трансферази у хворих на ПВКГ з української популяції.

**Мета дослідження** – визначення частоти розподілу поліморфних генотипів гену GST (GSTP1, GSTM1 і GSTT1) та їх асоціації з розвитком та прогресуванням ПВКГ.

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено у Київській міській клінічній офтальмологічній лікарні «Центр мікрохірургії ока». Визначення стадії глаукоми проводили за класифікацією первинної глаукоми А. П. Нестерова (2008) та класифікацією периметричних змін за стадіями глаукоми [6]. У дослідженні прийняли участь 172 хворих (344 ока) з ПВКГ I-IV стадій та 98 добровольців (196 очей), у жодного з яких не було встановлено діагноз «глаукома», що склали контрольну групу. Всі пацієнти були розподілені на 4 групи відповідно до стадії глаукоматозного процесу. 1 групу склали 38 пацієнтів з I (початковою) стадією ПВКГ, 2 групу – 44 пацієнти з II (розвинутою) стадією, 3 групу – 40 пацієнтів з III стадією (подальше прогресуванням та звуження полів зору) і 4 групу – 50 пацієнтів з IV (термінальною) стадією.

Всім хворим виконано візометрію, комп'ютерну периметрію Humphrey, тонометрію, біомікроскопію, офтальмоскопію, гоніоскопію, кератопахиметрію, оптичну когерентну томографію зорового нерва.

Дослідження поліморфізмів варіантів генів GSTP1, GSTM1 та GSTT1 здійснювали з використанням уніфікованих тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США) в автоматичному ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Кров для дослідження брали натще з ліктьової вени (5 мл). Для статистичного аналізу результатів дослідження використовували пакет MedStat і MedCalc v.15.1 (MedCalc Software bvba). Асоціацію алелей та генотипів з ПВКГ визначали за величиною відношення шансів (ВШ); межі 95% вірогідного інтервалу (ВІ) для ВШ розраховували за методом J. Neuman. Відмінності визначали статистично вірогідними при  $p < 0,05$ . Для перевірки вірогідності відмінностей між групами використовувався  $\chi^2$  та точний критерій Фішера.

Всі дослідження проведені з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Хельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1975, з подальшими доповненнями, включаючи версію 1983 р.) та Наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Хворі на ПВКГ та пацієнти контрольної групи були ознайомлені з метою та завданнями дослідження та дали письмовий дозвіл на використання результатів досліджень в наукових цілях.

### Результати і їх обговорення

В результаті проведеного дослідження були проаналізовані комбінації поліморфних варіантів генів GSTP1, GSTM1 та GSTT1 (табл. 1). Виявлено 11 комбінацій генетичних варіантів, частота яких мала відмінності як між контролем та групами хворих на ПВКГ, так і між самими групами хворих ( $\chi^2=112,63$ ;  $p=0,00E-01$ ). Комбінація генотипів GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1-null не була виявлена ані в контрольній групі, ані у пацієнтів з ПВКГ.

В контрольній групі найбільш часто (у 40% обстежених) зустрічались комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1-null та GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1+ (по 20%); у 18% пацієнтів були визначені генотипи GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1+\*GSTT1+ та у 11% – генотипи GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+. Загалом дані комбінації генотипів (GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1-null, GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1+, GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1+\*GSTT1+ та GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+) мали більшість (дві третини) пацієнтів з групи контролю. Комбінації генотипів GSTP1(Val/Val)\*GSTM1+\*GSTT1-null

та GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1-null в групі контролю визначені не були.

У пацієнтів з ПВКГ найбільшу поширеність мали дещо інші комбінації генотипів: GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null (30%), GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1+\*GSTT1+ (22%) та GSTP1(Val/Val)\*GSTM1+\*GSTT1+ (12%). При цьому, якщо найчастішою комбінацією генотипів у 1-й групі була GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1+\*GSTT1+ (26%), то вже з 2-ї групи більшу поширеність набувала – GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null, яка спостерігалася у 25% пацієнтів цієї групи, а у пацієнтів 3-ї та 4-ї груп – у 30% та 46%, відповідно.

У пацієнтів 1 групи не було встановлено наявності таких комбінацій генотипів: GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1+, GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1+\*GSTT1-null, GSTP1(Val/Val)\*GSTM1+\*GSTT1-null та GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1-null. Пацієнти 1 групи у 18% випадків мали комбінацію генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+, а генотипи GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1-null та GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+ були відмічені у 26% пацієнтів (по 13%).

**Таблиця 1.** Розподіл зустрічаємості та частоти генотипів у групах пацієнтів

Генотипи		Контр- роль	Групи				All HT
			1	2	3	4	
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1+	n	10	7	0	0	0	17
	f	0,10	0,18	0,00	0,00	0,00	0,06
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1-null	n	20	5	4	2	0	31
	f	0,20	0,13	0,09	0,05	0,00	0,11
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1+	n	20	0	4	3	2	29
	f	0,20	0,00	0,09	0,07	0,04	0,11
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1-null	n	6	6	11	12	23	58
	f	0,06	0,16	0,25	0,30	0,46	0,21
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1+	n	18	10	10	9	9	56
	f	0,18	0,26	0,23	0,23	0,18	0,21
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	n	4	0	2	2	2	10
	f	0,04	0,00	0,05	0,05	0,04	0,04
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	n	11	4	4	2	2	23
	f	0,11	0,11	0,09	0,05	0,04	0,09
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1+	n	8	1	5	4	10	28
	f	0,08	0,03	0,11	0,10	0,20	0,10
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	n	0	0	1	1	1	3
	f	0,00	0,00	0,02	0,03	0,02	0,01
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	n	1	5	3	3	0	12
	f	0,01	0,13	0,07	0,07	0,00	0,04
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1-null	n	0	0	0	2	1	3
	f	0,00	0,00	0,00	0,05	0,02	0,01
<i>Всього</i>		<b>98</b>	<b>38</b>	<b>44</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>270</b>

Примітки: n – кількість; f – частота;  $\chi^2=112,63$ ; All HT – всі генотипи; df=40;  $p=0,00E-01$

Загалом, найбільш часто комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null та GSTP1(Ile/Val)\*GSTM1+\*GSTT1+ були відмічені, відповідно, у 25% та 23% пацієнтів 2-ї групи, у 30% та 23% пацієнтів 3-ї групи та у 46% та 18% пацієнтів 4-ї групи.

У пацієнтів 2-ї групи не були визначені такі комбінації генотипів: GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+ та GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1-null. У пацієнтів 3-ї групи не була визначена тільки комбінація генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+, а у пацієнтів 4-ї групи були відсутні комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+, GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1-null та GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+.

Як показав статистичний аналіз, значущі відмінності частот розподілу комбінацій генотипів були виявлені між контрольною групою та всіма групами пацієнтів з ПБКГ ( $\chi^2=54,68$ ,  $p=0,00E-01$ ). Частоти генетичних поліморфізмів генів GSTP1, GSTM1 та GSTT1 відрізнялися у пацієнтів контрольної групи та хворих на ПБКГ 1-ї групи ( $p(\chi^2)=0,001$ ); пацієнтів контрольної групи та хворих на ПБКГ 2-ї групи ( $p(\chi^2)=0,003$ ) та між пацієнтами контрольної групи та хворими на ПБКГ 3-ї та 4-ї груп ( $p(\chi^2)=0,00E-01$ ), що наведено у таблиці 2. Тож дані статистичних порівнянь наочно свідчили на користь наявності зв'язку між варіабельними генотипами генів глутатіон-S-трансферази та розвитком ПБКГ.

При порівнянні розподілу частот комбінацій генотипів у групах встановлено, що вірогідна різниця була наявна між пацієнтами 1 та 2 груп ( $p(\chi^2)=0,031$ ), між 1 та 3 групами ( $p(\chi^2)=0,019$ ), між 1 та 4 групами

**Таблиця 2.** Значущість відмінностей в розподілі частот генотипів між групами

Групи		Генотипи		
		$\chi^2$	df	$p(\chi^2)$
Контроль	1-а+2-а+3-я + 4-а	54,68	10	0,000
Контроль	1-а	25,73	8	0,001
Контроль	2-а	24,76	9	0,003
Контроль	3-я	36,31	10	0,000
Контроль	4-а	58,39	10	0,000
1-а	2-а	18,41	9	0,031
1-а	3-я	21,27	10	0,019
1-а	4-а	40,16	10	0,000
2-а	3-я	3,50	9	0,941
2-а	4-а	14,96	9	0,092
3-я	4-а	10,58	9	0,305

Примітки:  $\chi^2$  – критерій ксі-квадрат за Pearson; df – число ступенів свободи;  $p(\chi^2)$  – значущість відмінностей (при значенні менше 0,05 – відмінності значущі)

( $p(\chi^2)<0,00E-01$ ). В той же час не було встановлено значущих відмінностей в розподілі комбінацій генотипів між пацієнтами 2, 3 та 4 груп ( $p(\chi^2)>0,09$ ). У цьому сенсі можна зазначити, що пацієнти 1 групи мали I (початкову) стадію хвороби, тоді як пацієнти інших груп – прогресуючу ПБКГ, що вказувало на імовірне значення генотипів також і для прогресування захворювання.

В подальшому був проведений детальний розгляд асоціації окремих комбінацій генотипів генів GSTP1, GSTM1 та GSTT1 із захворюванням для кожної групи (табл. 3-6). Для пацієнтів 1 групи (табл. 3) в порівнянні з контрольною групою асоціацію с захворюванням було встановлено для комбінації генотипів GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+ ( $p_{Fet}=0,007$ ,  $VH=14,7$ ;  $VI=1,66-130,42$ ).

Тож поліморфізмами, що мали асоціацію з розвитком ПБКГ, були «нульові» алелі GSTM1-null та гомозиготний стан мутантної алелі Val гену GSTP1 – GSTP1(Val/Val). Комбінація генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1+ в групі пацієнтів з 1 стадією ПБКГ не виявлена, тож можна припустити, що алеллю високого ступеня ризику розвитку глаукоми є Val у гені GSTP1, а не «нульова алель» гену GSTM1. При цьому ризик розвитку захворювання у носіїв комбінації генотипів GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+ був збільшеним майже у 15 разів.

При аналізі комбінативних варіантів генотипів GSTP1, GSTM1 та GSTT1 між контрольною та 2 групами (табл. 4) встановлено асоціативний зв'язок із захворюванням комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null ( $p_{Fet}=0,003$ ,  $VH=5,11$ ;  $95\%VI=1,75-14,92$ ).

Можна припустити, що розвиток захворювання скоріше обумовлював кумулятивний ефект двох «нульових» алелей генів GSTT1 та GSTM1, що призводило до значного зменшення ферментативної активності глутатіон-S-трансферази і, як наслідок, – активації оксидативного стресу. За показником VH ризик розвитку ПБКГ у носіїв комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null був збільшений більш ніж у 5 разів у порівнянні з контролем.

В 2-й групі не було виявлено носіїв комбінації предкових генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+, що свідчило про протективний ефект цього генетичного варіанту для прогресування ПБКГ.

Аналогічні дані щодо асоціації патологічного процесу з комбінацією генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null були виявлені (табл. 5) у пацієнтів 3-ї групи ( $p_{Fet}=4,0E-4$ ,  $VH=6,57$ ;  $95\%VI=2,26-19,11$ ). Було відмічено, що у носіїв цієї комбінації генотипів прогресія захворювання з II до III стадії супроводжувалася збільшенням як значущості за критерієм Фішера, так і – VH (ризик розвитку III стадії ПБКГ збільшувався майже у 7 разів).

Як і у пацієнтів 2-ї групи, у 3 групі не було виявлено комбінацію генотипів GSTP1(Ile/

**Таблиця 3.** Значущість відмінностей розподілу частот генотипів між контрольною групою і хворими на ПГКВ 1-ї групи та ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи	Групи		p <sub>Fet</sub>	ВШ	±95% ВІ
	1-а	Контроль			
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1+	0,18	0,10	0,247	1,99	0,70-5,67
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1-null	0,13	0,20	0,460	0,59	0,20-1,71
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1+	0,00	0,20	0,001	0,00	0,00-N/A
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,16	0,06	0,094	2,88	0,87-9,55
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,26	0,18	0,347	1,59	0,66-3,85
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,00	0,04	0,576	0,00	0,00-N/A
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,11	0,11	1,000	0,93	0,28-3,12
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,03	0,08	0,444	0,30	0,04-2,52
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,00	0,00	-	-	-
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,13	0,01	0,007	14,70	1,66-130,42
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,00	0,00	-	-	-

Примітки: p<sub>Fet</sub> – значущість відмінностей між групами за Fisher exact test (two-tailed);  $\chi^2$  – критерій ксі-квадрат за Pearson; p( $\chi^2$ ) – значущість відмінностей (при значенні менше 0,05 відмінності значущі); ВШ – відношення шансів; ±95% ВІ – ±95% вірогідний інтервал для величини ВШ

**Таблиця 4.** Значущість відмінностей розподілу частот генотипів між контрольною групою і хворими на ПГКВ 2-ї групи та ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи	Групи		p <sub>Fet</sub>	ВШ	±95% ВІ
	2-а	Контроль			
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1+	0,00	0,10	0,031	0,00	0,00-N/A
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1-null	0,09	0,20	0,145	0,39	0,12-1,22
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1+	0,09	0,20	0,145	0,39	0,12-1,22
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,25	0,06	0,003	5,11	1,75-14,92
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,23	0,18	0,649	1,31	0,55-3,12
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,05	0,04	1,000	1,12	0,20-6,35
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,09	0,11	1,000	0,79	0,24-2,64
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,11	0,08	0,541	1,44	0,44-4,69
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,02	0,00	0,310	max.	N/A-max.
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,07	0,01	0,088	7,10	0,72-70,26
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,00	0,00	-	-	0,00-N/A

Примітки: ті ж самі, що у таблиці 3

**Таблиця 5.** Значущість відмінностей розподілу частот генотипів між контрольною групою і хворими на ПГКВ 3-ї групи та ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи	Групи		p <sub>Fet</sub>	ВШ	±95% ВІ
	3-а	Контроль			
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1+	0,00	0,10	0,063	0,00	0,00-N/A
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1-null	0,05	0,20	0,038	0,21	0,05-0,92
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1+	0,07	0,20	0,080	0,32	0,09-1,13
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,30	0,06	4,0 E-4	6,57	2,26-19,11
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,23	0,18	0,638	1,29	0,52-3,18
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,05	0,04	1,000	1,24	0,22-7,04
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,05	0,11	0,346	0,42	0,09-1,97
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,10	0,08	0,745	1,25	0,35-4,41
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,03	0,00	0,290	max.	N/A-max.
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,07	0,01	0,073	7,86	0,79-78,03
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,05	0,00	0,082	max.	N/A-max.

Примітки: ті ж самі, що у таблиці 3

**Таблиця 6.** Значущість відмінностей розподілу частот генотипів між контрольною групою і хворими на ПГКВ 4-ї групи та ступінь їх асоціації з захворюванням

Генотипи	Групи		p <sub>Fet</sub>	ВШ	±95% ВІ
	4-а	Контроль			
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1+	0,00	0,10	0,016	0,00	0,00-N/A
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1+* GSTT1-null	0,00	0,20	2,0E-4	0,00	0,00-N/A
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1+	0,04	0,20	0,007	0,16	0,04-0,73
GSTP1(Ile/Ile)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,46	0,06	0,000	13,06	4,83-35,35
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,18	0,18	1,000	0,98	0,40-2,36
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,04	0,04	1,000	0,98	0,17-5,54
GSTP1(Ile/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,04	0,11	0,220	0,33	0,07-1,55
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1+	0,20	0,08	0,060	2,81	1,03-7,66
GSTP1(Val/Val)*GSTM1+* GSTT1-null	0,02	0,00	0,338	max.	N/A-max.
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1+	0,00	0,01	1,000	0,00	0,00-N/A
GSTP1(Val/Val)*GSTM1-null* GSTT1-null	0,02	0,00	0,338	max.	N/A-max.

Примітки: ті ж самі, що у таблиці 3

Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+. Крім того, була відмічена значуща відмінність для комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1-null, частота якої була знижена в 4 рази в порівнянні з контрольною групою ( $p_{Fet}=0,038$ ,  $VШ=0,21$ ;  $95\%BI=0,05-0,92$ ), що свідчило про протективний ефект ще й цього варіанту генотипів.

Серед пацієнтів 4 групи (табл. 6) асоціацію захворювання також було встановлено для комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null ( $p_{Fet}=0,000$ ,  $VШ=13,06$ ;  $95\%BI=4,83-35,35$ ). Отже, ризик розвитку глаукоми за критерієм  $VШ$  у носіїв цієї комбінації генотипів був збільшеним у 13 разів.

Серед пацієнтів цієї групи, як і серед пацієнтів 3 групи, не було виявлено носіїв комбінацій протективних генотипів: GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+ і GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1-null. Крім того, частота комбінації генотипів GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1+ була значущо (в 5 разів) нижче, ніж у контролі ( $p_{Fet}=0,007$ ,  $VШ=0,16$ ;  $95\%BI=0,04-0,73$ ).

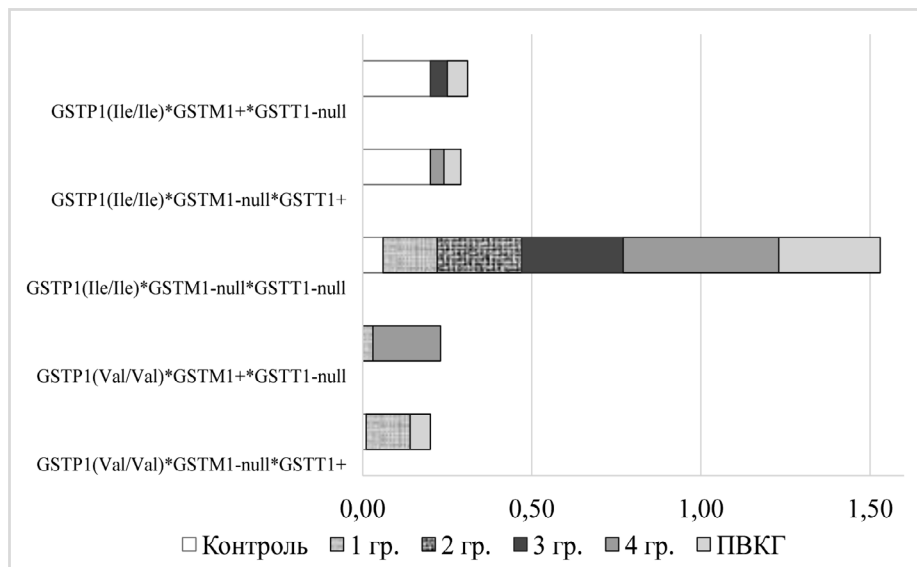
Отже, такі дані вказували на загальну закономірність – в міру прогресування ПВКГ збільшувалася відносна кількість носіїв комбінації генотипів ризику GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null, тоді як частота протективних комбінацій (GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+, GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1-null і GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1+) зменшувалася.

Проведений аналіз поліморфізмів генотипів генів глутатіон-S-трансферази показав вірогідність зв'язку як розвитку ПВКГ (на підставі порівняння частоти генотипів у контрольній групі та у групах пацієнтів з ПВКГ), так і перебігу захворювання (оскільки частоти комбінацій генотипів, що зустрічалися у пацієнтів 1-ї групи, мали суттєві відмінності від таких у пацієнтів інших груп). Комбінація генотипів, що переважно обумовлювала розвиток та прогресію глаукоми у хворих 2-ї, 3-ї та 4-ї груп, була ідентичною – GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null, при цьому

в міру прогресії захворювання частота цього генотипу та його асоціація з захворюванням збільшувалися. Зв'язок делеційних «нульових» генотипів гена GST (GSTM1-null і GSTT1-null) з розвитком та прогресуванням ПВКГ вже було показано у наших попередніх дослідженнях [7].

Дослідження варіабельності генотипів у пацієнтів з ПВКГ може пояснити особливості перебігу захворювання та прогресії патологічного процесу. В патогенезі ПВКГ суттєве місце займає активація процесів оксидативного стресу. Під впливом активних форм вільних радикалів може відбуватися порушення реологічних властивостей крові, що в свою чергу відіграє суттєву роль в патогенезі глаукомної оптичної нейропатії [1]. Крім того, внаслідок активації оксидативного стресу відбуваються й зміни трабекулярної стінки шлемова каналу. Продукти перекисного окиснення ліпідів та активні форми кисню здатні ушкоджувати клітини трабекулярного ендотелію й призводити до порушення дренажної системи передньої камери ока [1]. Експериментальними дослідженнями А. Izzotti зі співавт. (2009) показано, що оксидативне ушкодження клітин трабекулярної мережі призводить до порушення току внутрішньоочної вологи та є тригером «глаукоматозного каскаду», а антиоксидант глутатіон має протективні властивості [10].

Таким чином, генетичні поліморфізми генів глутатіон-S-трансферази GSTP1, GSTM1 та GSTT1, що призводять до зниження антиоксидантної активності, відіграють суттєву роль як в ініціації глаукоматозного процесу, так і в прогресії захворювання в цілому. Аналіз розподілу генотипів між контрольною та експериментальними групами показав, що найбільш частим (серед всіх комбінацій генотипів при ПВКГ) було поєднання двох «нульових» алелей генів GSTM1 та GSTT1 (рис. 1). В той же час наявність предкового генотипу GSTP1(Ile/Ile) у поєдненні з обома або



**Рис. 1.** Розподіл частот генотипів у групах порівнянь.

На діаграмі представлені генотипи, для яких виявлена значущість відмінностей ( $p_{Fet}<0,05$ ) в групах порівнянь з різними комбінаціями генотипів та асоціативний зв'язок із захворюванням

хоча б з одним повноцінним (не нульовим) варіантом генів GSTM1 або GSTT1 мало протективний ефект у відношенні прогресування ПВКГ.

### Висновки

1. Встановлено вірогідні відмінності частот комбінацій генотипів генів глутатіон-S-трансферази GSTP1, GSTM1 та GSTT1 між контрольною групою (пацієнти без ПВКГ) та всіма групами пацієнтів з ПВКГ ( $\chi^2=54,68$ ,  $p=0,00E-01$ ). Частота генетичних поліморфізмів відрізнялася між контрольною та 1 ( $p(\chi^2)=0,001$ ), 2 ( $p(\chi^2)=0,003$ ), 3 та 4 групами ( $p(\chi^2)=0,00E-01$ ).

2. Комбінацією генотипів ризику розвитку I стадії ПВКГ виявилася GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+, наявність якої збільшувала ризик у 15 разів. Комбінація генотипів GSTP1Ile/Ile\*GSTM1-null\*GSTT1-null була пов'язана з прогресією захворювання, збільшення її частоти та посилення асоціації з ПВКГ відповідали збільшенню тяжкості патологічного процесу: для носіїв цієї комбінації генотипів ризик розвитку ПВКГ II стадії був у 5,1 рази, III стадії – у 6,6 рази та IV стадії – у 13 разів більшим у порівнянні з контролем.

3. Наявність предкового генотипу GSTP1(Ile/Ile) у сполученні з обома або хоча б з одним повноцінним (не нульовим) варіантом генів GSTM1 або GSTT1 мало протективний ефект у відношенні прогресування ПВКГ (генотипи GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\*GSTT1+, GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1+\* GSTT1-null і GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1+).

### Литература

1. **Еричев В. П.** О патогенезе первичной открытоугольной глаукомы / В. П. Еричев, Е. А. Егоров, 2014 // Вестник офтальмологии. – 2014. – № 6. – С. 98-104.
2. **Кириленко М. Ю.** Генетические исследования первичной открытоугольной глаукомы / М. Ю. Кириленко, М. И. Чурносков // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2014. – Т. 19, Вып.4. – С. 1140-1142.
3. **Колесов С. А.** Новые данные о диагностических возможностях цитозольных глутатион S-трансфераз / С. А. Колесов, Р. С. Рахманов, Т. В. Блинова, Л.А. Страхова // Межд. журн. прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 3. – С. 577-580.

4. **Могілевський С. Ю.** Гендерні та вікові особливості асоціації поліморфізму Pro72Arg гена TP53 з первинною відкритокутовою глаукомою/ С. Ю. Могілевський, С. В. Зяблицев, Л. І. Денисюк, // Офтальмол. журнал. – 2016. – № 4. – С. 15-19.
5. **Могілевський С. Ю.** Математичний аналіз значення поліморфізму Pro72Arg гену TP53 у виникненні та прогресуванні первинної відкритокутової глаукоми / С. Ю. Могілевський, С. В. Зяблицев, Л. І. Денисюк, В. Г. Гур'янов // Офтальмол. журнал. – 2016. – № 6. – С. 32-37.
6. **Нестеров А. П.** Глаукома / А. П. Нестеров – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 360 с.
7. **Риков С. О.** Асоціація делеційних поліморфізмів гена глутатіон-S-трансферази у хворих на первинну відкритокутову глаукому / С. О. Риков, А. В. Бурдей // Архів офтальмології України. – 2017. – Т. 5, № 3 (9). – С. 61-67.
8. **Тепляков А. Т.** Сердечная недостаточность: Клинико-генетические аспекты ишемического ремоделирования и апоптоза миокарда в развитии сердечной недостаточности / А. Т. Тепляков, Е. Н. Березикова, С. Н. Шилов – Томск: SST, 2015. – 400 с.
9. **Fingert J. H.** Primary open-angle glaucoma genes / J.H. Fingert // Eye (Lond). – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 587-595.
10. **Izzotti A.** Sensitivity of ocular anterior chamber tissues to oxidative damage and its relevance to the pathogenesis of glaucoma / A. Izzotti, S.C. Sacca, M. Longobardi, C. Cartiglia // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2009. – Vol. 50, № 11. – P. 5251-5258.
11. **Quigley H. A.** The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 / H. A. Quigley, A. T. Broman / Br. J. Ophthalmol. – 2006. – Vol. 90. – P. 262-267.
12. **Wang W.** Association of glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) with primary open-angle glaucoma: an evidence-based meta-analysis / W. Huang, M. Zhou, S. Chen, X. Zhang // Gene. – 2013. – V. 526 (2). – P. 80-86.
13. **Yu Y.,** Association of glutathione S transferases polymorphisms with glaucoma: a meta-analysis / Y. Yu, Y. Weng, J. Guo, G. Chen, K. Yao // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, №1 – e54037. doi: 10.1371/journal.pone.0054037.

Поступила 12.03.2018



## Распределение полиморфных генотипов гена глутатион-S-трансферазы (GSTP1, GSTM1 и GSTT1) и их ассоциативная связь с первичной открытоугольной глаукомой

Рыков С. А., Бурдей А. В., Зяблицев С. В., Могилевский С. Ю.

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика; Киев (Украина)

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца; Киев (Украина)

**Введение.** На современном этапе подтверждена роль генетических факторов в развитии первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). В патогенезе ПОУГ одним из важных механизмов является активация окислительного стресса со снижением активности ферментов семейства глутатион-S-трансферазы (GST). Учитывая существенные различия частоты полиморфизмов гена GST в различных популяциях и противоречивые данные о наличии ассоциативных связей с ПОУГ, целесообразно провести такие исследования у больных из украинской популяции.

**Цель** исследования – определение частоты распределения полиморфных генотипов гена GST (GSTP1, GSTM1 и GSTT1) и их ассоциации с развитием и прогрессированием ПОУГ.

**Материал и методы.** В исследовании приняли участие 172 больных с ПОУГ I-IV стадий и 98 добровольцев без такого диагноза, которые составили контрольную группу. Все пациенты с ПОУГ были распределены на 4 группы в соответствии со стадией глаукомы по А.П. Нестерову (2008): 1 группу составили 38 пациентов с I (начальной) стадией; 2 группу – 44 пациента со II (развитой) стадией; 3 группу – 40 пациентов с III (с прогрессией и сужением полей зрения) стадией и 4 группу – 50 пациентов с IV (терминальной) стадией и развитием слепоты. Исследование полиморфизма генов осуществляли с использованием унифицированных тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для статистического анализа результатов исследования использовали пакет MedStat и MedCalc v.15.1 (MedCalc Software bvba).

**Результаты.** Выявлено 11 комбинаций генетических вариантов, частоты которых имели значимые различия как между контролем и группами больных ПОУГ, так и между самими группами пациентов ( $\chi^2=112,63$ ;  $p=0,00E-01$ ). Значимые различия частот обнаружены между контрольной группой и всеми группами больных ( $\chi^2=54,68$ ,  $p=0,00E-01$ ). Частота генетических полиморфизмов отличалась по двустороннему критерию Фишера между контрольной и I ( $p(\chi^2)=0,001$ ), 2 ( $p(\chi^2)=0,003$ ), 3 и 4 группами ( $p(\chi^2)=0,00E-01$ ). Наличие генотипа GSTP1(Val/Val)\*GSTM1-null\*GSTT1+ увеличивало риск развития I стадии ПОУГ в 15 раз. Генотип GSTP1(Ile/Ile)\*GSTM1-null\*GSTT1-null был связан с прогрессией заболевания (для носителей этого генотипа риск развития ПОУГ II стадии был в 5,1 раза, III стадии – в 6,6 раза и IV стадии – в 13 раз больше по сравнению с контролем). Наличие предкового генотипа GSTP1(Ile/Ile) в сочетании хотя бы с одним полноценным (не нулевым) вариантом генов GSTM1 или GSTT1 имело протективный эффект в отношении прогрессирования ПОУГ.

**Выводы.** Полиморфные генотипы генов глутатион-S-трансферазы (GSTP1, GSTM1 и GSTT1), которые приводят к снижению антиоксидантной активности, играют существенную роль как в возникновении, так и в прогрессировании ПОУГ. При этом патогенетическое значение имело сочетание двух мутантных «нулевых» аллелей генов (GSTM1-null та GSTT1-null). Сочетание предкового генотипа GSTP1(Ile/Ile) с обоими или хотя бы с одним полноценным вариантом (GSTM1+ или GSTT1+) имело протективный эффект.

**Ключевые слова:** первичная открытоугольная глаукома, гены глутатион-S-трансферазы, GSTP1, GSTM1, GSTT1