

УДК 617.7-007.681-021.3:616-001.18-036.17-07+577.11

Прогнозування розвитку та прогресування первинної відкритокутової глаукоми на підставі визначення поліморфізмів генів глутатіон-S-трансферази

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

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

² Національний медичний університет імені О.О. Богомольця Київ (Україна)

E-mail: sergey.mogilevskyy@gmail.com

Вступ. Епідеміологічні дослідження свідчать, що первинна відкритокутова глаукома (ПВКГ) є складним багатофакторним захворюванням і виникає в результаті сукупної взаємодії факторів ризику та генетичних поліморфізмів. Нами раніше була показана роль делеційних поліморфізмів генів глутатіон-S-трансферази (GSTM1 та GSTT1) у виникненні та прогресуванні ПВКГ.

Мета – прогнозування швидкості розвитку ПВКГ при первинному зверненні пацієнта та швидкості її прогресування на підставі визначення поліморфізмів генів глутатіон-S-трансферази (GSTT1, GSTP1 та GSTM1).

Матеріал та методи. З використанням багатофакторної регресії з пакета загальних регресійних моделей (GRM) були проаналізовані дані 172 пацієнтів з ПВКГ I-IV стадій та контрольної групи (98 осіб). Для аналізу даних по швидкості розвитку патологічного процесу було використано два показника: швидкість розвитку глаукоми за стадіями (стадія/рік життя) – ШРПВКГ та швидкість прогресування за стадіями (стадія/рік хвороби) – ШППВКГ. 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.

Результати. Був розроблений алгоритм (комп'ютерна програма) прогнозування швидкості розвитку та прогресування ПВКГ при первинному зверненні пацієнта. Найбільший відносний внесок в прогнозування і ШРПВКГ, і ШППВКГ вносили нуклеотидний поліморфізм гена GSTP1 Pе105Val (наявність мутантної алелі Val) та делеційні поліморфізми генів GSTM1 та GSTT1. Регресійне рівняння прогнозування розвитку ПВКГ мало високий ступінь впливу незалежних змінних на розрахунковий показник: коефіцієнт множинної кореляції $R=0,801$; коефіцієнт детермінації $R^2=0,622$ при $F=77,338$ і $p<0,0001$. Для рівняння прогнозування швидкості прогресування ПВКГ $R=0,857$; $R^2=0,734$ при $F=73,450$ і $p<0,0001$.

Висновок. Таким чином, було здійснено прогнозування віку початку клінічних проявів ПВКГ та швидкості її розвитку, яку можна було розрахувати вже при первинному зверненні пацієнта.

Ключові слова:

первинна відкритокутова глаукома, поліморфізм генів GSTP1, GSTM1 та GSTT1, швидкість розвитку та прогресування

Вступ. Первинна відкритокутова глаукома (ПВКГ) складає приблизно 80% випадків всіх глауком і є однією з головних причин слабкозорості та сліпоти серед дорослого населення [1, 2]. За попередніми оцінками, ПВКГ може стати причиною необоротної сліпоти приблизно для 60 мільйонів осіб у всьому світі до 2020 року [2]. Результати вітчизняних та міжнародних досліджень свідчать про значне збільшення поширеності ПВКГ з віком: для середнього віку (40-45 років) показник захворювання на ПВКГ складає 0,1% населення, для похилого віку (50-60 років) – 1,5-2%, а для старшого віку (75 років і старше) – 10% населення [3, 4].

Діагностика ПВКГ включає в себе виявлення факторів ризику, які діляться на системні та локальні. До системних факторів ризику належать: похилий вік, расова і спадкова схильність, судинні захворювання, гіперхолестеринемія, гіпотиреоз, цукровий діабет та куріння; до локальних: індивідуальні особливості анатомії головки зорового нерва, дренажної системи і судинних структур ока, наявність супутніх захворювань ока [4, 5].

© Риков С.О., Бурдей А.В., Зяблицев С.В., Могілевський С.Ю., 2018

Отже, дані епідеміологічних досліджень свідчать, що ПВКГ є складним багатофакторним захворюванням і виникає в результаті сукупної взаємодії факторів ризику та генетичних поліморфізмів [6, 7]. Доведено, що дана патологія має спадкову схильність, а вплив генетичних факторів коливається від 20 до 60% [8, 9]. Нашими дослідженнями [10] показана роль делеційних поліморфізмів генів глутатіон-S-трансферази у виникненні та прогресуванні ПВКГ.

Практичне застосування результатів молекулярно-генетичних досліджень, присвячених вивченню ролі генетичних факторів у патогенезі тих чи інших захворювань, як правило реалізується через побудову математичних моделей, здатних прогнозувати розвиток захворювання або його ускладнень. В основі високої точності таких прогнозів лежить незмінність протягом життя генотипу людини, що також визначає довгострокову актуальність отриманих результатів. З огляду на наші попередні результати [10], які підтвердили наявність асоціативного зв'язку з ПВКГ поліморфних генотипів генів сімейства GST, представлялося доцільним розробити математичні моделі, які змогли б описати вплив генотипу на прогресування захворювання і / або визначити в якому віці слід очікувати ту чи іншу стадію хвороби.

Мета дослідження - прогнозування швидкості розвитку ПВКГ при первинному зверненні пацієнта та швидкості її прогресування на підставі визначення поліморфізмів генів глутатіон-S-трансферази (GSTT1, GSTP1 та GSTM1).

Матеріал і методи

Для вирішення поставлених завдань в якості моделі була використана багатофакторна регресія з пакета загальних регресійних моделей (GRM) з покроковим включенням предикторів. В аналіз були включені дані пацієнтів з ПВКГ I-IV стадій (172 особи) та контрольної групи (98 осіб). Визначення стадії глаукоми проводили за класифікацією первинної глаукоми А. П. Нестерова і А. Я. Буніна (1976 р.) та класифікацією периметричних змін за стадіями глаукоми.

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.

Для аналізу даних по швидкості розвитку патологічного процесу було використано два показника: швидкість розвитку глаукоми за стадіями (стадія/рік життя) – ШР_{ПВКГ} та швидкість прогресування за стадіями (стадія/рік хвороби) – ШП_{ПВКГ}. Ці показники прогресивно збільшувалися з підвищенням стадії патологічного процесу ($p < 0,05$).

Дослідження поліморфізмів гена GSTP1 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. Делеційні поліморфізми GSTT1 і GSTM1 визначали ПЛР з електрофоретичною детекцією (набір реагентів «АмпліСенс® GSTT1/GSTM1-EPh»; ТОВ «ІНТЕРЛАБСЕРВІС», Росія).

Для статистичного аналізу результатів дослідження використовували пакет Statistica 10 (Statsoft, Inc., USA).

Результати та їх обговорення

При виборі незалежних змінних (предикторів) керувалися міркуваннями практичного використання розроблених прогностичних моделей. У зв'язку з цим, відібрано показники, головними властивостями яких були незмінні характеристики або закономірна динаміка в перебігу життя пацієнта. Іншою важливою властивістю предикторів мали бути доступність і легкість їх отримання при первинному обстеженні хворих. Отже, до таких показників ми віднесли: стать, вік і результати генотипування досліджуваних поліморфізмів генів сімейства GST, вплив яких на перебіг захворювання нами вже було доведено [10].

Всі розробки велися з урахуванням вагових характеристик предикторів. Відповідність предикторів і залежних змінних до категоріальних, безперервних і індикаторних значень, які були використані при побудові регресійних рівнянь, наведена в таблиці 1.

Отримані коефіцієнти регресійного рівняння для залежних змінних ШР_{ПВКГ} і ШП_{ПВКГ} та статистична значущість їх відмінності від нульової гіпотези наведені в таблицях 2 та 3, відповідно.

Аналіз величин коефіцієнтів регресії β , показав, що найбільший відносний внесок в передбачення загальної залежної змінної, як для ШР_{ПВКГ} так і для ШП_{ПВКГ} мали такі предиктори «GSTT1» (0,0047±0,0013 і 0,4361±0,0937, відповідно), «GSTP1» (0,0038±0,0009 і 0,3212±0,0632, відповідно) та «GSTM1» (0,0036±0,0012 і 0,2557±0,0854, відповідно). Перелічені показники демонстрували прямий зв'язок зі значеннями залежних змінних.

Деяка інша ситуація склалася з іншими двома предикторами. Як для ШР_{ПВКГ} так і для ШП_{ПВКГ} відносний внесок змінної «Стать» в абсолютному вираженні перевищував такий для змінної «Вік» (0,0007±0,0001 проти 0,0001±0,0003 і 0,0629±0,0199 проти 0,0014±0,0010, відповідно). У той же час характер зв'язку предикторів із залежними змінними був протилежним.

Крім того, аналіз статистичної значущості відмінностей β -коефіцієнтів предикторів від нульового варіанту показав, що при розрахунку регресійного рівняння для ШР_{ПВКГ} змінна «Вік» може не використовуватися, з огляду на її низьку значущість ($t = -1,559$; $p = 0,060$).

Таблиця 1. Відповідність показників регресійних рівнянь категоріальним, безперервним і індикаторним значенням

Показники	Категоріальне значення	Індикаторні значення	Назва змінних регресії	Застосовується для розрахунків
Стать	Ч	101	С	індикаторне значення
	Ж	102		
Вік	-	-	В	безперервне значення
GSTP1	Ile/Ile	101	P1	індикаторне значення
	Ile/Val	102		
	Val/Val	103		
GSTM1	+	101	M1	індикаторне значення
	- (null)	102		
GSTT1	+	101	T1	індикаторне значення
	- (null)	102		
ШР _{пвкг}	-	-	ШР _{пвкг}	безперервне значення
ШП _{пвкг}	-	-	ШП _{пвкг}	безперервне значення

Таблиця 2. Коефіцієнти регресійного рівняння та їх статистична значущість для залежної змінної ШР_{пвкг}

Показники	$\beta \pm SE$	t	p
Стать	0,0007 \pm 0,0001	2,4130	1,650E-02
Вік	-0,0001 \pm 0,0003	-1,5590	0,0601
GSTP1	0,0038 \pm 0,0009	4,4032	1,549E-05
GSTM1	0,0036 \pm 0,0012	3,0759	2,318E-03
GSTT1	0,0047 \pm 0,0013	3,6330	3,363E-04
Вільний показник	-1,2813 \pm 0,2514	-5,1249	5,743E-07

Примітки: $\beta \pm SE$ – β -коефіцієнт і його стандартна помилка; t – критерій Стюдента; p – статистична значущість відмінностей у порівнянні з нульовою гіпотезою (приймається при $p < 0,05$)

Таблиця 3. Коефіцієнти регресійного рівняння та їх статистична значущість для залежної змінної ШП_{пвкг}

Показники	$\beta \pm SE$	t	p
Стать	-0,0629 \pm 0,0199	-2,6721	8,050E-03
Вік	0,0014 \pm 0,0010	2,32134	2,110E-02
GSTP1	0,3212 \pm 0,0632	5,09458	7,038E-07
GSTM1	0,2557 \pm 0,0854	2,99565	3,023E-03
GSTT1	0,4361 \pm 0,0937	4,65381	5,370E-06
Вільний показник	-95,5044 \pm 18,5515	-5,1686	4,938E-07

Примітки: $\beta \pm SE$ – β -коефіцієнт і його стандартна помилка; t – критерій Стюдента; p – статистична значущість відмінностей у порівнянні з нульовою гіпотезою (приймається при $p < 0,05$)

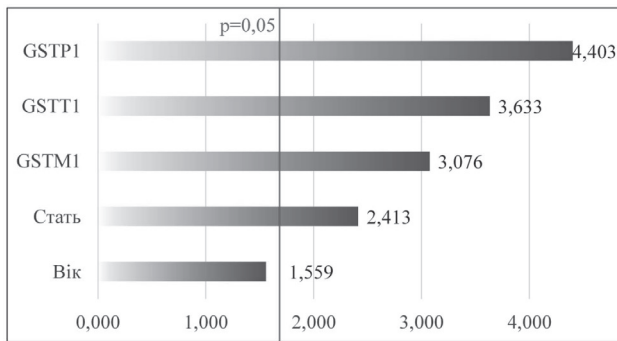


Рис. 1. Діаграма Парето для β -коефіцієнтів регресійного рівняння для залежної змінної ШР_{ПВКГ}. По горизонтальній осі – значення t-коефіцієнту Ст'юдента, значущість на рівні $p=0,05$ зображена вертикальною лінією

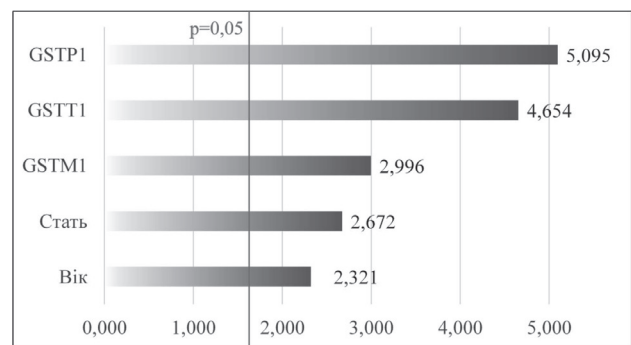


Рис. 2. Діаграма Парето для β -коефіцієнтів регресійного рівняння для залежної змінної ШП_{ПВКГ}. По горизонтальній осі – значення t-коефіцієнту Ст'юдента, значущість на рівні $p=0,05$ зображена вертикальною лінією

Демонстраційна презентація статистичної значущості β -коефіцієнтів регресійних рівнянь для залежних змінних ШР_{ПВКГ} і ШП_{ПВКГ} представлена на діаграмах Парето на рисунках 1 і 2, відповідно. Предиктори розташовані у напрямку зниження значень критерію Ст'юдента (t).

Таким чином формула для розрахунку ШРПВКГ може бути представлена в такій редакції:

$$\text{ШР}_{\text{ПВКГ}} = -1,28134 + 0,00067 * C + 0,00382 * P1 + 0,00356 * M1 + 0,00472 * T1 \quad (1)$$

де: C – індикаторне значення статі пацієнта; P1 – індикаторне значення генотипу GSTP1; M1 – індикаторне значення генотипу GSTM1;

T1 – індикаторне значення генотипу GSTT1.

Дослідження основних характеристик множинної регресії в цілому показало високий ступінь впливу незалежних змінних на розрахунковий показник: коефіцієнт множинної кореляції $R=0,801$; коефіцієнт детермінації, що характеризував відповідність моделі фактичним даним – $R^2=0,622$ при $F=77,338$ і $p<0,0001$.

Регресійне рівняння для розрахунку ШП_{ПВКГ} може бути представлено таким чином:

$$\text{ШП}_{\text{ПВКГ}} = -95,5044 - 0,0629 * C + 0,014V + 0,3212 * P1 + 0,2557 * M1 + 0,4361 * T1 \quad (2)$$

де: C – індикаторне значення статі пацієнта; V – безперервне значення віку; P1 – індикаторне значення генотипу GSTP1; M1 – індикаторне значення генотипу GSTM1; T1 – індикаторне значення генотипу GSTT1.

Загальна характеристика даного регресійного рівняння: $R=0,857$; $R^2=0,734$ при $F=73,450$ і $p<0,0001$, що вказувало на досягнення прийнятних результатів в побудові моделі прогнозування ШП_{ПВКГ}.

На додаток до цього був проведений аналіз відмінностей між фактичними і розрахунковими значеннями для залежних змінних ШР_{ПВКГ} і ШП_{ПВКГ}, який наведений у таблиці 4.

Графічне відображення відмінностей між фактичними і розрахованими значеннями ШР_{ПВКГ} і ШП_{ПВКГ} наведено на рисунках 3 та 4, відповідно.

Таким чином, були вирішені поставлені задачі, а саме – здійснено прогнозування віку початку клінічних проявів ПВКГ та швидкості її розвитку, яку можна було розрахувати вже при первинному зверненні пацієнта.

Висновки

1. З використанням регресійного аналізу був розроблений алгоритм (комп'ютерна програма) прогнозу-

Таблиця 4. Різниця між фактичними і розрахунковими значеннями ШР_{ПВКГ} і ШП_{ПВКГ}

Показники	Me (Q1;Q3)	T	$P_{(T)}$	ρ	$P_{(\rho)}$
Фактичне значення ШР _{ПВКГ}	0,019 (0,016; 0,022)	347,0	2,16E-27	0,651	0,033
Прогнозоване значення ШР _{ПВКГ}	0,014 (0,010; 0,014)				
Фактичне значення ШП _{ПВКГ}	1,000 (1,000; 1,500)	990,0	1,85E-18	0,720	0,021
Прогнозоване значення ШП _{ПВКГ}	0,866 (0,593; 0,642)				

Примітки: Me (Q1; Q3) – медіана, 1-й і 3-й квартилі; T – критерій T для парного тесту Вілкосона (Wilcon Matched Pairs Test); ρ – коефіцієнт рангової кореляції Спірмена; $p_{(T)}$ і $p_{(\rho)}$ – статистична значущість відмінностей для відповідних тестів, прийнята при $p<0,05$

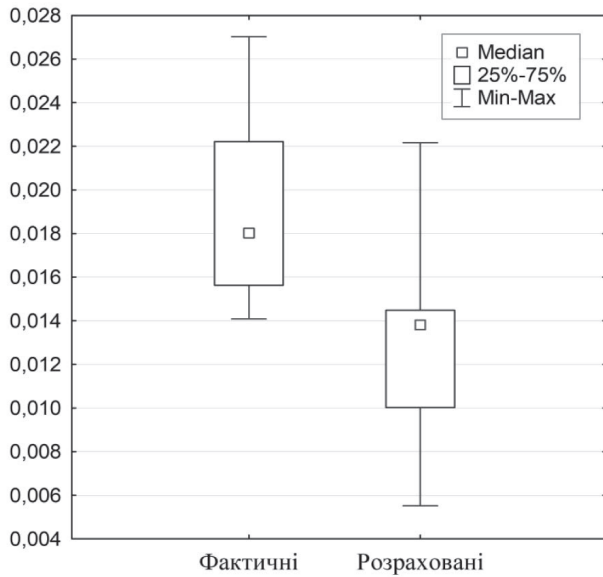


Рис. 3. Фактичні та розраховані значення ШР_{ПВКГ}

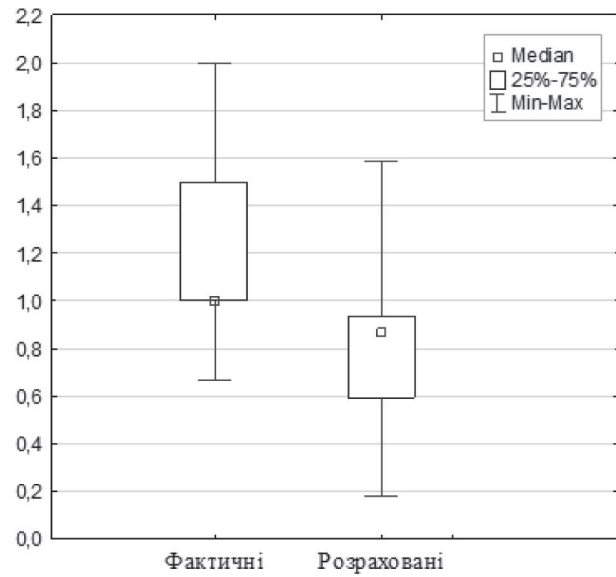


Рис. 4. Фактичні та розраховані значення ШП_{ПВКГ}

вання швидкості розвитку та прогресування ПВКГ при первинному зверненні пацієнта. Найбільший відносний внесок в прогнозування і ШРПВКГ, і ШППВКГ вносили такі предиктори: «GSTT1» ($0,0047 \pm 0,0013$ і $0,4361 \pm 0,0937$, відповідно), «GSTP1» ($0,0038 \pm 0,0009$ і $0,3212 \pm 0,0632$, відповідно) та «GSTM1» ($0,0036 \pm 0,0012$ і $0,2557 \pm 0,0854$, відповідно).

2. Регресійне рівняння прогнозування розвитку ПВКГ мало високий ступінь впливу незалежних змінних на розрахунковий показник: коефіцієнт множинної кореляції $R=0,801$; коефіцієнт детермінації $R^2=0,622$ при $F=77,338$ і $p<0,0001$. Для рівняння прогнозування швидкості прогресування ПВКГ $R=0,857$; $R^2=0,734$ при $F=73,450$ і $p<0,0001$.

Литература

1. World Health Organization. Blindness and visual impairment (accessed Oct 2017). <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/blindness-and-visual-impairment>
2. Weinreb R. N., Aung T., Medeiros F. A. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review. JAMA 2014; 311:1901-11. [PMID: 24825645].
3. Нестеров А. П. Глаукома / А. П. Нестеров. – Москва: ООО «Медицинское информационное агентство». – 2008. – 360 с.
4. The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. Am J Ophthalmol. 2000 Oct;130(4):429-440.
5. 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, № 3. – P. 262-270.
6. Ojha P., Wiggs J. L., Pasquale L. R. The genetics of intraocular pressure. Semin Ophthalmol 2013; 28:301-5. [PMID: 24138038].
7. Huang W., Wang W., Zhou M. et al. Association of glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) with primary open-angle glaucoma: an evidence-based meta-analysis. Gene 2013; 526:80-6. [PMID: 23747403].
8. Суркова В. К. О роли генетической предрасположенности к развитию первичной открытоугольной глаукомы / В. К. Суркова, А. З. Сафина, О. И. Оренбуркина // Глаукома. – 2007. – № 4. – С. 21-22.
9. Liu Y. Molecular genetics in glaucoma / Y. Liu, R. Allingham // Experimental eye research. – 2011. – Vol. 93, № 4. – P. 331-339.
10. Риков С. О., Бурдей А. В. Асоціація делеційних поліморфізмів гену глутатіон-S-трансферази з первинною відкритокутовою глаукомою / С.О. Риков, А.В. Бурдей // Архів офтальмології України. – 2017. – Т. 5, №3 (9). – С.61-67.

Поступила 30.05.2018

Прогнозирование развития и прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы на основании определения полиморфизмов генов глутатион-S-трансферазы

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

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

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

Введение. Эпидемиологические исследования показывают, что первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) является сложным многофакторным заболеванием и возникает в результате совокупного взаимодействия факторов риска и генетических полиморфизмов. Нами ранее была показана роль делеционных полиморфизмов генов глутатион-S-трансферазы (GSTM1 и GSTT1) в возникновении и прогрессировании ПОУГ.

Цель исследования – прогнозирование скорости развития ПОУГ при первичном обращении пациента и скорости ее прогрессирования на основании определения полиморфизмов генов глутатион-S-трансферазы (GSTT1, GSTP1 и GSTM1).

Материал и методы. С использованием многофакторной регрессии из пакета общих регрессионных моделей (GRM) были проанализированы данные 172 пациентов с ПОУГ I-IV стадий и контрольной группы (98 человек). Для анализа данных по скорости развития патологического процесса было использовано два показателя: скорость развития глаукомы по стадиям (стадия/год жизни) – СРПВКГ и скорость прогрессирования по стадиям (стадия/год болезни) – СППВКГ. Исследование полиморфизмов гена GSTP1 осуществляли с использованием унифицированных тест-систем TaqMan Mutation Detection Assays Life-Technology (США) в автоматическом амплифика-

ре Gene Amp® PCR System 7500 (Applied Biosystems, США) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Делеционные полиморфизмы GSTT1 и GSTT1 определяли путем ПЦР с электрофоретической детекцией (набор реагентов «Ампли-Сенс® GSTT1/GSTM1-EPh» ООО «ИНТЕРЛАБСЕРВИС», Россия).

Результаты. Был разработан алгоритм (компьютерная программа) прогнозирования скорости развития и прогрессирования ПОУГ при первичном обращении пациента. Наибольший относительный вклад в прогнозирование и СРПВКГ, и СППВКГ вносили нуклеотидный полиморфизм гена GSTP1 Ile105Val (наличие мутантной аллели Val) и делеционные полиморфизмы генов GSTM1 и GSTT1. Регрессионное уравнение прогнозирования развития ПОУГ имело высокую степень влияния независимых переменных на расчетный показатель: коэффициент множественной корреляции $R=0,801$; коэффициент детерминации $R^2=0,622$ при $F=77,338$ и $p<0,0001$. Для уравнения прогнозирования скорости прогрессирования ПОУГ $R=0,857$; $R^2=0,734$ при $F=73,450$ и $p<0,0001$.

Вывод. Таким образом, было осуществлено прогнозирование возраста начала клинических проявлений ПОУГ и скорости ее развития, которую можно было рассчитать уже при первичном обращении пациента.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, полиморфизм генов GSTP1, GSTM1 и GSTT1, скорость развития и прогрессирования