

С. О. Риков¹, С. Ю. Могілевський¹, Ю. Ю. Биць¹, В. Є. Досенко²¹ Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України
– м. Київ, Україна,² Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України
– м. Київ, Україна

УДК 617.741–004.1–036.4:575.17

БАГАТОФАКТОРНИЙ СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ГЕНЕТИЧНИХ ПОЛІМОРФІЗМІВ НА КЛІНІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПРИ ВІКОВІЙ КАТАРАКТІ

Вікова катаракта є однією з основних причин сліпоти у світі і знаходиться на другому місці серед причин зниження гостроти зору. Безсумнівним вважається роль генетичних факторів у етіології цього захворювання, яке має полігенний мультифакторний характер. Ця обставина ускладнює аналіз даних генетичних досліджень, бо потрібно брати до уваги сукупний вплив багатьох генетичних предикторів, які, кожен окремо, можуть проявляти чітку асоціацію із захворюванням, але в комбінації статистична значущість, як правило, втрачається. У зв'язку з цим застосування сучасних методів багатофакторного аналізу є абсолютно необхідне для адекватної оцінки значущості певних генетичних варіацій у виникненні патології.

Мета роботи: провести багатофакторний статистичний аналіз впливу генетичних поліморфізмів на клінічні показники при віковій катаракті.

Результати та їх обговорення. Кореляційно-регресійний аналіз показав асоціацію між поліморфізмами генів *CRYGB* і *PSMA6* та гостротою зору з корекцією, показниками ступеня зрілості катаракти NO, NC, C та P за класифікацією LOCS III і не показав жодного зв'язку між поліморфізмом гену *LMP2* та показниками, які були включені до аналізу.

Ключові слова: вікова катаракта, поліморфізм генів, кристалін, протеасома, багатофакторний аналіз.

Вікова катаракта є однією з основних причин сліпоти у світі і знаходиться на другому місці серед причин зниження гостроти зору [3]. Безсумнівним вважається роль генетичних факторів у етіології цього захворювання, яке має полігенний мультифакторний характер [4, 5]. Згадана обставина ускладнює аналіз даних генетичних досліджень, бо потрібно брати до уваги сукупний вплив багатьох генетичних предикторів, які, кожен окремо, можуть проявляти чітку асоціацію із захворюванням, але в комбінації статистична значущість, як правило, втрачається. У зв'язку з цим застосування сучасних методів багатофакторного аналізу є абсолютно необхідним для адекватної оцінки значущості певних генетичних варіацій у виникненні патології.

У попередніх наших публікаціях [2] наведено інформацію про асоціацію поліморфізму G⁻⁴⁷→A гену *CRYGB* із розвитком вікової катаракти, при цьому інші досліджені поліморфізми (C⁻⁸→G гену *PSMA6* та Arg₆₀→His гену *LMP2*) не показали статистичної значущості як фактора ризику катарактогенезу [1]. Але яким чином вказані поліморфізми проявляють свою значущість за мультифакторного аналізу? Це і визначило мету нашої роботи.

Мета роботи: провести багатофакторний статистичний аналіз впливу генетичних поліморфізмів на клінічні показники при віковій катаракті.

Матеріали та методи. Матеріалом дослідження був букальний епітелій 96 осіб, хворих на вікову катаракту. Про наявність катаракти у пацієнтів досліджуваної групи робили висновок на основі даних біомікроскопії переднього відрізка ока. До контрольної групи увійшли 96 осіб, котрі не мали ознак вікової катаракти.

G⁻⁴⁷→A поліморфізм промотору гену *CRYGB* визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) за власною методикою.

Алельний поліморфізм гену *PSMA6* (C⁻⁸→G) та гену *LMP2* (Arg₆₀→His) визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Багатофакторний статистичний аналіз був виконаний за допомогою програмного забезпечення SPSS (версії 22.0), а також із застосуванням статистичного середовища R (версії 3.0). Усі кількісні показники були проаналізовані на нормальність розподілу даних за допомогою тесту Колмогорова–Смірнова. Для виявлення можливої асоціації між одонуклеотидними поліморфізмами і клінічними показниками та побудови математичних моделей нами були застосовані методи лінійної регресії та метод однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA, Analysis of variance). З метою визначення рівності дисперсій між групами був застосований тест Левайна. У разі значення $p > 0.05$ групи

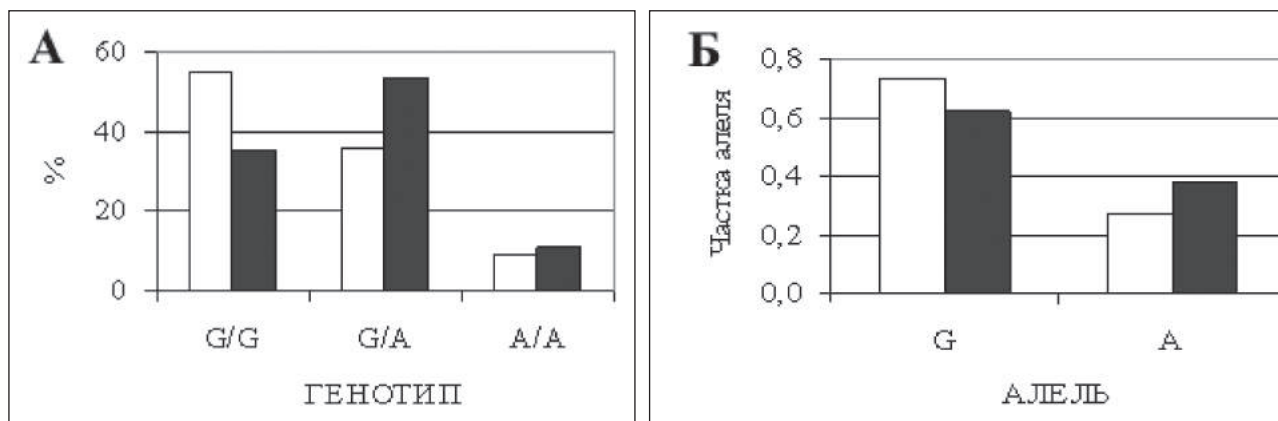


Рис. 1. Розподіл генотипів (А) та алелів (Б) гену γ -кристаліну (поліморфізм промотору $G^{-47} \rightarrow A$) у практично здорових людей без ознак вікової катаракти (білі стовпчики) та у хворих на катаракту (чорні стовпчики)

вважалися гомогенними (гомоскедастичними), і для подальших розрахунків застосовувався класичний метод дисперсійного аналізу. У випадку, коли результат тесту Левайна показував статистично значущу різницю, застосовувалися тести Брауна–Форсайта та Уелча, які є модифікаціями однофакторного дисперсійного аналізу. Всі результати вважалися статистично значущими при $p < 0.05$.

Результати та їх обговорення. Проведення генотипування пацієнтів за геном *CRYGB* з катарактою та без її ознак дозволило нам встановити, що розподіл генотипів у цих групах суттєво відрізняється, відхилення від закону розподілу не спостерігалось. Було встановлено такий розподіл алельних варіантів: G/G – 35,37%, G/A – 53,66%, A/A – 10,98% у хворих на катаракту та G/G – 55,06%, G/A – 35,96%, A/A – 8,99% у контрольній групі (рис. 1А). Проведений статистичний аналіз із застосуванням χ^2 -критерію Пірсона встановив вірогідність розподілу алельних варіантів ($P=0,03$). Аналіз розподілу алелів (рис. 1Б) також вирізняє групу хворих на катаракту – частота мінорного алеля становила 0,38 (в контрольній групі – 0,27, $P=0,03$).

При дослідженні розподілу генотипів за геном *PSMA6* нами була встановлена така частота алельних варіантів: C/C – 78,13%, C/G – 18,75%, G/G – 3,13%

у хворих на катаракту та C/C – 70,53%, C/G – 26,32%, G/G – 3,16% у контрольній групі (рис. 2А). Частота мінорного алеля у досліджуваній групі становила 0,11 (в контрольній 0,15) (рис. 2Б). Проведений статистичний аналіз із застосуванням χ^2 -критерію Пірсона не показує статистично значимої відмінності у розподілі генотипів ($p=0,45$) та алелів ($p=0,22$) у досліджуваних групах.

Далі нами із застосуванням статистичних методів було проведено аналіз зв'язку визначених поліморфізмів *CRYGB* та *PSMA6* із наступними показниками клінічного обстеження пацієнтів: гострота зору без корекції, гострота зору з корекцією, вік пацієнтів, стать та показники ступеня зрілості катаракти за класифікацією LOCS III, а саме NO, NC, C та P.

Серед усіх проаналізованих параметрів нам вдалося встановити вірогідні відмінності стосовно декількох із них. Так, поліморфізм гену *CRYGB* впливав на кориговану гостроту зору – NO, NC, C та P, а поліморфізм гену конституційної протеасоми *PSMA6* впливав на гостроту зору з корекцією, показники NO та NC. Поліморфізм гену *LMP2* не впливав на жодний з досліджених показників.

Нижче наводяться дані саме стосовно асоціації генетичних показників із клінічними параметрами, які видаються вірогідними.

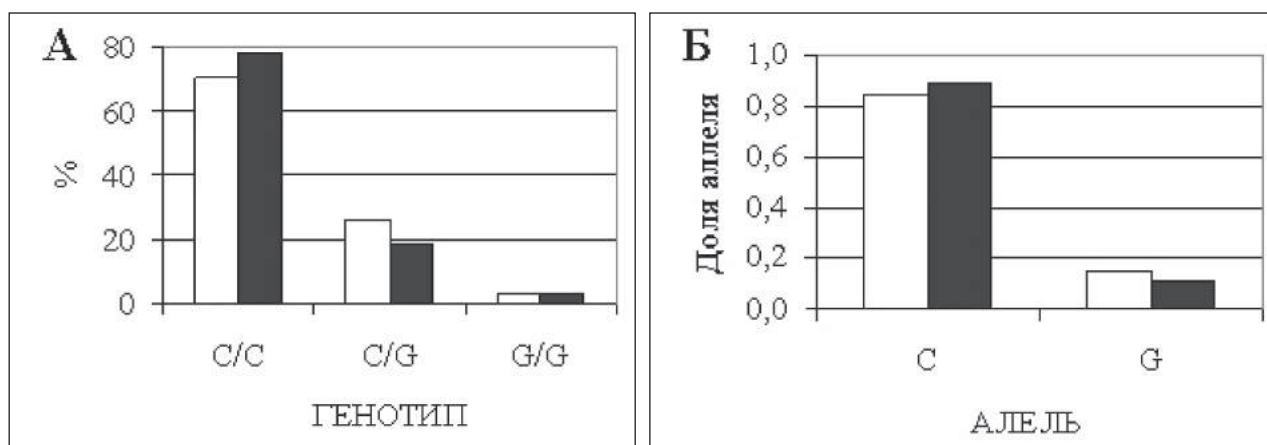


Рис. 2. Розподіл генотипів (А) та алелів (Б) гену *PSMA6* ($C^{-8} \rightarrow G$) у пацієнтів з віковою катарактою (білі стовпчики) та без неї (чорні стовпчики)

Таблиця 1

Результати аналізу можливої асоціації однонуклеотидних поліморфізмів G⁻⁴⁷→A із коригованою гостротою зору за допомогою лінійної регресії

Предиктори	Коефіцієнт регресії	p	Верхній 95% довірчий інтервал	Нижній 95% довірчий інтервал
CryGB	-0.12	p < 0.05	-0.20	-0.04
PSMA6	-0.17	p < 0.05	-0.25	-0.09
Константа	0.82	p < 0.05	0.89	0.76

Таблиця 2

Дані про вплив поліморфізмів генів CRYGB та PSMA6 на показник NO (Nuclear Opalescence) за класифікацією LOCS III

Предиктори	Коефіцієнт регресії	p	Нижній 95% довірчий інтервал	Верхній 95% довірчий інтервал
CryGB	0.42	p < 0.05	0.27	0.58
PSMA6	0.36	p < 0.05	0.21	0.52
Константа	1.9	p < 0.05	1.8	2.0

Результати аналізу можливої асоціації однонуклеотидних поліморфізмів G⁻⁴⁷→A та C⁻⁸→G із коригованою гостротою зору за допомогою лінійної регресії наведені у табл. 1.

Використавши метод лінійної регресії, ми дійшли до висновку, що найкращий прогноз за гостротою зору серед пацієнтів з віковою катарактою є у тих, хто має у генотипі обидва мажорних алеля за обома дослідженими поліморфізмами, а найгірший прогноз мають пацієнти із генотипом A/A (поліморфізм G⁻⁴⁷→A) та G/G (поліморфізм C⁻⁸→G). Це узгоджується з отриманими даними щодо ризику розвитку катаракти, де нами був доведений вплив G⁻⁴⁷→A поліморфізму на розвиток цієї патології, а саме: нижчим був відсоток розвитку катаракти у пацієнтів, котрі мали G/G генотип.

Результати дисперсійного аналізу гостроти зору в залежності від генотипу однонуклеотидного поліморфізму (G⁻⁴⁷→A) показали статистично значущу різницю, що дозволило нам зробити висновок: гетерозиготний генотип, а також мінорний генотип асо-

ціюються із зниженою гостротою зору, в той час як найбільш розповсюджений генотип – із вищими значеннями гостроти зору. Графічно ці результати зображені на рис. 3А та 3Б.

У табл. 2 наведені дані про вплив поліморфізмів генів CRYGB та PSMA6 на показник NO (Nuclear Opalescence) за класифікацією LOCS III отримані із використанням методу лінійної регресії.

Використання методу лінійної регресії дало змогу встановити, що наявність у пацієнта мінорного алеля у генотипі за обома поліморфізмами підвищує прогнозований рівень показника NO. Це дає змогу нам припустити, що ці пацієнти будуть мати більш виражену катаракту у порівнянні з пацієнтами, котрі, насамперед, мають найбільш розповсюджений генотип.

Дисперсійний аналіз рівня показника NO в залежності від генотипів однонуклеотидних поліморфізмів CRYGB та PSMA6 показали статистично значущу різницю, що дозволило нам прийти до висновку: гетерозиготний генотип та мінорний генотип асоціюються із нижчим рівнем показника NO, в той час як най-

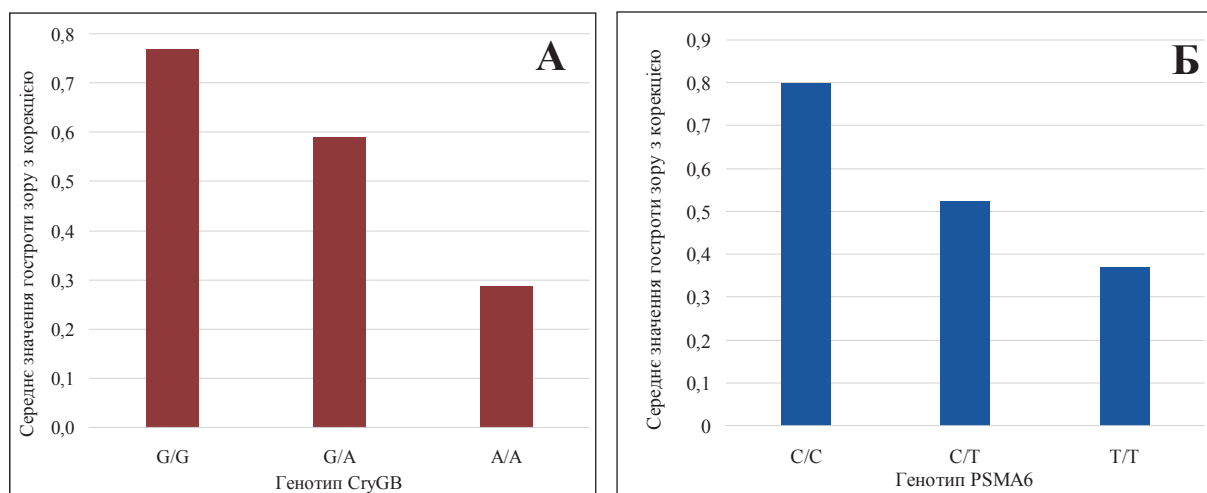


Рис 3. А – Графік залежності коригованої гостроти зору від генотипу CRYGB; Б – графік залежності гостроти зору від генотипу PSMA6

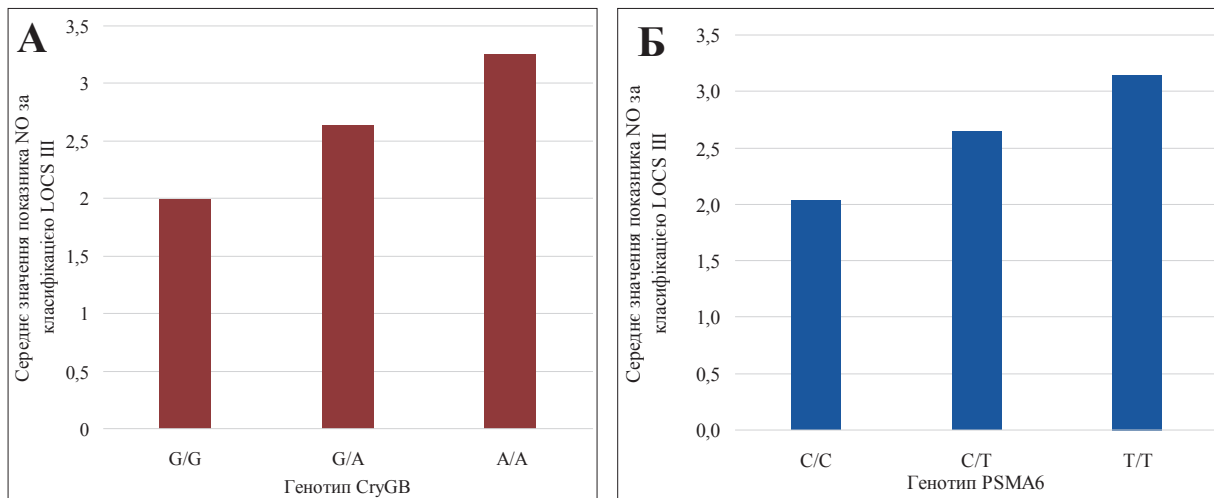


Рис. 4. А – залежність показника NO за класифікацією LOCS III від генотипу *CRYGB*; Б – залежність показника NO за класифікацією LOCS III від генотипу *PSMA6*

більш розповсюджений генотип – із вищими значеннями NO. Графічно ці результати зображені на рис. 4А та 4Б.

Проведений статистичний аналіз дозволив встановити зв'язок поліморфізмів *CRYGB* та *PSMA6* із цілим рядом клінічних показників, передусім – зі ступенем зрілості катаракти за класифікацією LOCS III, де чотири із чотирьох показників показали зв'язок із генотипом пацієнтів. Аналіз впливу поліморфізму гена *LMP2* не показав жодного вірогідного зв'язку із наведеними вище клінічними показниками. Отримані дані дозволяють стверджувати: значно більшою мірою на оптичні характеристики кришталика впливають генетичні варіанти гена *CRYGB*, що цілком логічно, бо саме з білка, який кодує цей ген, складається кришталік, а також поліморфізм субодиниці конституційної протеасоми (*PSMA6*), але не генетичні варіанти субодиниці імунопротеасоми (*LMP2*). Ці дані повністю вкладаються в концепцію механізму розвитку катаракти, згідно якої патогенез захворювання складається із порушення продукції кристаліну та уповільнення протеасомної утилізації ушкоджених білків.

Висновки

1. Кореляційно-регресійний аналіз показав асоціацію між поліморфізмами генів *CRYGB* і *PSMA6* та гостротою зору з корекцією, показниками ступеня зрілості катаракти NO, NC, C та P за класифікацією LOCS III.

2. Кореляційно-регресійний аналіз не показав жодного зв'язку між поліморфізмом гена *LMP2* та показниками, які було включено до аналізу.

Література

1. Рыков С. А. Оценка частоты полиморфизмов генов PSMA6 (C⁻⁸→G) и LMP2 (Arg₆₀→His) у пациентов с возрастной катарактой / С. А. Рыков, Ю. Ю. Быць, С. В. Гончаров, В. Е. Досенко // Офтальмология. Восточная Европа – 2015. – №3 (26). – С. 94–101.
2. Рыков С. О. Розподіл алельних варіантів промотору гену (G⁻⁴⁷→A) кристаліну у хворих на початкову та незрілу катаракту / С. О. Рыков, Ю. Ю. Быць, С. В. Гончаров, В. Е. Досенко // Офтальмологічний журнал – 2014. – №5 (460). – С. 20–23.
3. Нарушения зрения и слепота [Электронный ресурс] / ВОЗ. – Информационный бюллетень. – 2014. – № 282. – режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/ru1>.
4. Kapur S. Analysis of single nucleotide polymorphisms of CRYGA and CRYGB genes in control population of western Indian origin / S. Kapur, S. Mehra, D. Gajjar [et al.] // Indian J Ophthalmol. – 2009. – Vol. 57 (3). – P. 197–201.
5. Mehra S. Polymorphisms of the gamma crystallin A and B genes among Indian patients with pediatric cataract / S. Mehra, S. Kapur, A. Vasavada // J Postgrad Med. – 2011. – Vol. 57. – P. 201–205.

МНОГОФАКТОРНЫЙ СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ВОЗРАСТНОЙ КАТАРАКТЕ

С. А. Рыков, С. Ю. Могилевский, Ю. Ю. Быць, В. Е. Досенко

Возрастная катаракта является одной из основных причин обратимой слепоты в мире и находится на втором месте среди причин снижения остроты зрения. Бесспорной считается роль генетических факторов в этиологии этого заболевания, которое имеет полигенный мультифакторный характер. Последнее обстоятельство усложняет анализ данных генетических исследований, так как необходимо учитывать совокупное влияние многих генетических предикторов, которые, каждый в отдельности, могут проявлять четкую ассоциацию с

заболеванием, но в комбинации статистическая достоверность, как правило, теряется. В связи с этим применение современных методов многофакторного анализа является абсолютно необходимым для оценки значения определенных генетических вариаций в возникновении патологии.

Цель работы: провести многофакторный статистический анализ влияния генетических полиморфизмов на клинические показатели при возрастной катаракте.

Выводы. Корреляционно-регрессионный анализ показал ассоциацию между полиморфизмами генов *CRYGB* и *PSMA6* и остротой зрения с коррекцией, показателями степени зрелости катаракты NO, NC, C и P по классификации LOCS III и не показал связь между полиморфизмом гена *LMP2* и показателями, которые были включены в анализ.

Ключевые слова: *возрастная катаракта, полиморфизм генов, кристаллин, протеасома, многофакторный анализ.*

MULTYFACTOR ANALYSIS OF GENE POLIMORPHYSMS INFLUENCE ON CLINICAL INDICATORS OF AGE-RELATED CATARACT

S. O. Rykov¹, S. Y. Mogilevskyy¹, Y. Y. Byts¹, V. E. Dosenko²

¹National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupryk
of the Ministry of Public Health of Ukraine
Kyiv, Ukraine,

²National Medical University named after O. O. Bogomolets of the Ministry of Public Health of Ukraine
Kyiv, Ukraine

Introduction. Age-related cataract is the main cause of reverse blindness in the world and takes second place among causes of visual acuity decrease. It is doubtless that genetic factors play role in this disease that is polygenic disorder with multiple-factor etiology. The last point makes the analysis of genetic data more complicate, because single genetic predictor can have strong association with the disease, and this association is lost during analysis of few genetic predictors' combination. That is why it is necessary to use modern methods of multiple-factor analysis in order to make adequate assessment of genetic variation importance in pathology development.

The goal of the work is to perform multiple-factor analyses of risk factors of the age-related cataract.

Materials and methods. Polymorphisms of *CRYGB*, *PSMA6* and *LMP2* genes were estimated in buccal epithelium of 96 healthy persons and 96 persons with age-related cataract. Multiple-factor statistical analysis was performed using SPSS 22.0 software and statistical media R 3.0. To determine possible association between genes polymorphisms and clinical signs and to build mathematical models the methods of linear regression and single-factor analysis of variance were used (ANOVA, Analysis of variance). To estimate variance equality between groups Levene's test was used. In case when p value was higher than 0.05 the groups were accepted as homoscedastic, and classical method of variance analysis was applied.

Results and discussion. Using methods of statistical analysis the association was revealed between *CRYGB* and *PSMA6* genes polymorphisms and such clinical signs as: visual acuity without correction, visual acuity with correction, age and sex of patients, and indexes of cataract maturity NO, NC, C and P by LOCS III classification. Significant changes were estimated for some of the investigated parameters. The polymorphism of *CRYGB* gene has influence on best corrected visual acuity, NO, NC, C and P. The polymorphism of constitutive proteasomal subunit gene *PSMA6* has influence on best corrected visual acuity, NO and NC. *LMP2* gene polymorphism has not influence on investigated parameters.

Conclusions. The association between polymorphisms of *CRYGB* i *PSMA6* genes and best corrected visual acuity was revealed by correlation-regression analysis. Also the association between polymorphisms of *CRYGB* i *PSMA6* genes and indexes of cataract maturity NO, NC, C and P by LOCS III classification was shown. The association between polymorphisms of *LMP2* gene and indexes mentioned above was not revealed.

Key words: *age-related cataract, genes polymorphism crystalline proteasome, multiple-factor analysis*

Стаття надійшла до редакції 12.09.2016 р.