

Комплексная модель оценки риска развития и прогрессирования возрастной макулярной дегенерации

В. С. Акопян¹Н. С. Семенова¹Е. А. Новикова¹А. Г. Тоницкий² И. Н. Нечаев²

¹ Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель. Разработка метода и статистической модели для оценки индивидуального риска возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и риска прогрессирования ВМД до поздних стадий с учетом клинических и генетических факторов риска.

Методы. Для составления статистических моделей оценки риска применялась бинарная логистическая регрессия с функцией последовательного включения и исключения признаков. Для оценки популяционных различий в распространенности аллельных вариантов генов и разработки адаптированной модели для популяции московского региона проведено генотипирование и оценка влияния других факторов риска в двух группах испытуемых: больные ВМД различной стадии (n = 74) и контрольная группа (n = 116). Генетические факторы риска, включенные в исследование: полиморфизмы генов системы комплемента (C3 и CFH), полиморфизмы генов локуса 10q26 (ARMS2 и HTRA1), полиморфизм митохондриального гена MT-ND2. Клинические факторы риска, включенные в исследование: возраст, пол, высокий индекс массы тела, стаж курения.

Результаты. Проведен комплексный анализ генетических и клинических факторов риска ВМД в исследуемой группе. Составлена статистическая модель оценки индивидуального риска ВМД, чувствительность модели — 66,7%, специфичность — 78,5%, AUC = 0,76. Определены факторы риска поздней ВМД, составлена статистическая модель, описывающая вероятность поздней ВМД, чувствительность — 66,7%, специфичность — 78,3%, AUC = 0,73. Разработанная система позволяет определить наиболее вероятный вариант течения поздней ВМД — по экссудативному или неэкссудативному пути.

Заключение. Разработанная тест-система и математический алгоритм определения риска развития и риска прогрессирования ВМД имеют хорошую диагностическую информативность и перспективны для применения в клинической практике.

Ключевые слова: возрастная макулярная дегенерация, факторы риска

ABSTRACT

V. S. Akopyan, N. S. Semenova, E. A. Novikova, A. G. Tonivitskiy, I. N. Nechayev
The complex model of risk and progression of AMD estimation

Purpose: To develop a method and a statistical model to estimate individual risk of AMD and the risk for progression to advanced AMD using clinical and genetic risk factors.

Methods: A statistical risk assessment model was developed using stepwise binary logistic regression analysis. To estimate the population differences in the prevalence of allelic variants of genes and for the development of models adapted to the population of Moscow region genotyping and assessment of the influence of other risk factors was performed in two groups: patients with different stages of AMD (n = 74), and control group (n = 116). Genetic risk factors included in the study: polymorphisms in the complement system genes (C3 and CFH), genes at 10q26 locus (ARMS2 and HTRA1), polymorphism in the mitochondrial gene MT-ND2. Clinical risk factors included in the study: age, gender, high body mass index, smoking history.

Results: A comprehensive analysis of genetic and clinical risk factors for AMD in the study group was performed. Compiled statistical model assessment of individual risk of AMD, the sensitivity of the model — 66.7%, specificity — 78.5%, AUC = 0.76. Risk factors of late AMD, compiled a statistical model describing the probability of late AMD, the sensitivity of the model — 66.7%, specificity — 78.3%, AUC = 0.73. The developed system allows determining the most likely version of the current late AMD: dry or wet.

Conclusion: The developed test system and the mathematical algorithm for determining the risk of AMD, risk of progression to advanced AMD have fair diagnostic informative and promising for use in clinical practice.

Key words: AMD, risk factors

Увеличение заболеваемости возрастной макулярной дегенерацией (ВМД), стоимости лечения больных и экономического ущерба, наносимого нетрудоспособностью в связи с потерей зрения в исходе болезни, во многих странах является острой проблемой системы здравоохранения [1, 2]. Одним из подходов к уменьшению затрат на медицинское обслуживание больных ВМД является разработка тест-систем для скрининга, позволяющего выявить группу наибольшего риска ВМД и группу пациентов, имеющих наиболее высокий риск прогрессирования ВМД. Первичная профилактика, превентивное лечение и диспансерное наблюдение существенно улучшает прогноз в отношении сохранения зрения для данных пациентов [3, 4].

Целью настоящего исследования являлась разработка метода и статистической модели для оценки индивидуального риска ВМД и риска прогрессирования ВМД до поздних стадий с учетом клинических и генетических факторов риска.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы было обследовано 74 пациента (139 глаз) с ВМД различной стадии. Среди всех обследованных — 40,5% мужчин ($n = 30$). Возраст исследуемых в среднем составил 64,6 года (55,8-77,1) (медиана, 25-й — 75-й процентиля). Всем пациентам выполнялось расширенное офтальмологическое обследование. При распределении на группы использована классификация ВМД по системе AREDS (Age-Related Eye Disease Study), структура выборки представлена в таблице 1. Факторы риска, включенные в исследование: возраст, стаж курения, высокий индекс массы тела, наличие ВМД у родственников первой линии. Информация о стаже курения для статистического анализа преобразовывалась в баллы по следующей шкале: 0 — некурящие пациенты, 1 — курившие ранее (менее 10 пачко-лет), 2 — пациенты, курящие сейчас или имеющие стаж курения больше 10 пачко-лет. В группу популяционного контроля включено 116 здоровых доноров крови, проживающих в Москве.

Материалом генетического анализа служила ДНК исследуемых. ДНК выделяли из 100 мкл цельной крови с помощью наборов «Проба-ГС» производства ДНК-Технология (Россия). Проверка концентрации генетического материала проводилась на спектрофотометре NanoDrop ND1000. Проводилось генотипирова-

ние всех исследуемых по 5 генам и 6 полиморфизмам: ARMS2 A69S (rs10490924), CFHY402H (rs1061170), C3 (rs2230199), MTDNAA4917G (A4917G), HTRA1 (rs11200638), CFH (rs1329428). Разработана собственная тест-система для анализа данных вариантов генов, включающая материалы, праймеры, определенные специфические характеристики аллельных вариантов генов (температура плавления). Полиморфизмы определяли методом ПЦР в реальном времени, регистрация и учет результатов ПЦР проводился автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов ДТ-384 (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Данные обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Statistica 10. Для количественной оценки риска заболевания у носителей определенных аллелей и генотипов вычислялось отношение шансов (OR — oddsratio) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ). Подтверждение значимости выявленных генов-предикторов и выявление клинических факторов риска проводилось с использованием логистического регрессионного анализа.

Использована бинарная логистическая регрессия с функцией последовательного исключения или включения признаков и оценки вклада каждого параметра. На основе уравнения логистической регрессии составлена статистическая модель, описывающая вероятность ВМД или поздней ВМД. Оценка зависимости фенотипа от клинических и генетических факторов риска для дополнения прогностической модели проводили с использованием критерия χ^2 (по методу Пирсона и методу максимального правдоподобия). Для всех методов статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Для оценки диагностической информативности моделей построены характеристические ROC-кривые, определена AUC (площадь под ROC-кривой), чувствительность и специфичность каждой модели.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Анализ генетических полиморфизмов в группе ВМД и контрольной группе

Для каждого из исследуемых полиморфизмов были определены частоты генотипов, частоты встречаемости риск-аллелей в группе больных и группе контроля, отношения шансов (OR, oddsratio) для гомозигот и гетерозигот или мутантной аллели митохондриального

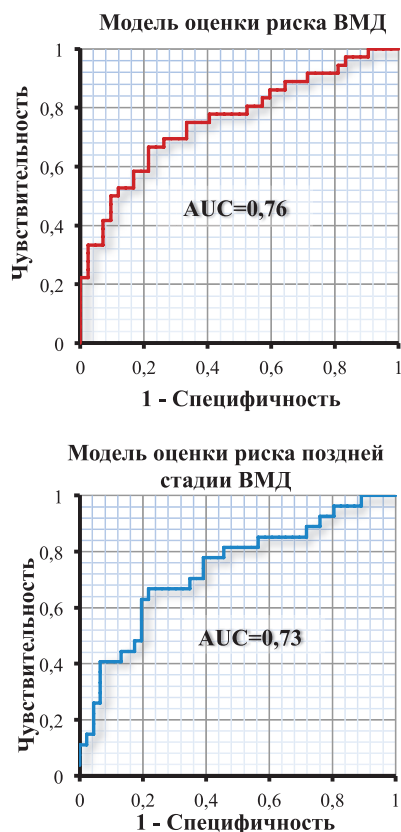


Рисунок 1. Характеристические кривые составленных статистических моделей.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов

Категория	Клинические проявления	Доля	Кол-во глаз
AREDS 1	Мелкие друзы/отсутствие ВМД	6%	9
AREDS 2	Средние друзы/дефекты ПЭС	22%	33
AREDS 3	Крупные друзы	33%	48
	Географическая атрофия не в макулярной зоне	7%	11
AREDS 4	Географическая атрофия в макулярной зоне	8%	12
	Отслойка ПЭС/нейроэпителия	12%	18
	ХНВ	8%	12
	Дисковидный рубец	4%	5

гена MT-ND2. Изучаемые полиморфизмы генов ARMS2 и HTRA1 имели полное сцепление и в группе больных, и в контрольной группе ($D' = 1,0$), поэтому далее их сочетание описывается и анализируется совместно, как вариант ARMS2/HTRA1. Зависимости других полиморфизмов друг от друга выявлено не было. Не было отмечено статистически значимых различий в частотах аллелей полиморфизма гена С3 компонента комплемента ($p = 0.844$), поэтому данный полиморфизм был исключен из дальнейшего анализа. Частоты полиморфизмов других четырех генов были значительно выше в группе больных ВМД ($p < 0.05$). Для количественной оценки риска был проведен расчет отношения шансов для каждого полиморфизма для гетерозигот и гомозигот. Выявлено, что наличие хотя бы одной риск-аллели данных полиморфизмов увеличивает риск ВМД более чем в 2 раза: для гетерозигот по ARMS2/HTRA1 OR = 2,18 (ДИ = [1.128-4.215], $p = 0.019$), для гетерозигот CFH rs1061170 OR = 2,00 (ДИ = [1.030-3.884], $p = 0.039$), для гетерозигот CFH rs1329428 OR = 2,83 (ДИ = [1.129-7.116], $p = 0.022$). Для одной мутантной аллели MT-ND2 отношение шансов составило 2,03 (ДИ = [1.005-4.136], $p = 0.044$).

Определенный риск для носителей двух мутантных аллелей, то есть гомозигот по риск-варианту полиморфизма был еще выше. Так, для гомозигот CFH rs1329428 риск ВМД возрастает в 3 раза (OR = 3,10, ДИ = [1.184-8.151], $p = 0.018$), для гомозигот CFH rs1061170 — почти в 4 раза (OR = 3,93, ДИ = [1.579-9.778], $p = 0.002$). Для гомозигот по ARMS2/HTRA1 риск ВМД возрастает более чем 8 раз (OR = 8,78, ДИ = [3.249-23.776], $p < 0.001$). Таким образом, данные полиморфизмы имеют высокую частоту среди больных ВМД и значительно по-

вышают риск болезни, поэтому могут служить основой для создания чувствительного и специфичного метода оценки индивидуального риска ВМД.

2. Построение статистической модели для оценки индивидуального риска ВМД

В результате анализа были отобраны предикторы и составлено уравнение логистической регрессии:

$$y = \text{const} + \sum_{i=1}^n \beta_i * X_i,$$

Значения переменных и коэффициентов уравнения представлены в таблице 2.

Вероятность заболевания, то есть риск ВМД, рассчитывается по формуле:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-y}}$$

Таким образом, определив значение переменных X для каждого испытуемого (количество риск-аллелей каждого полиморфизма, возраст), с помощью составленной модели можно определить индивидуальный риск развития ВМД.

Диагностическая информативность модели оценивалась методом бинарной логистической регрессии с графическим отображением данных в виде характеристической кривой (рис. 1). Для данной модели AUC составил 0,76, что говорит о хорошей прогностической силе модели. Чувствительность теста составила 66,7%, специфичность — 78,5%. Для стратификации риска ВМД все возможные значения уравнения логистической регрессии сгруппированы в 3 категории: первая категория — среднепопуляционный риск, вторая — высокий риск и третья категория — очень высокий риск развития ВМД. Для каждой категории определен интервал вероятности и медиана, представлена зависимость риска ВМД от возраста по категориям (рис. 2).

3. Анализ генетических и клинических факторов риска развития поздней ВМД

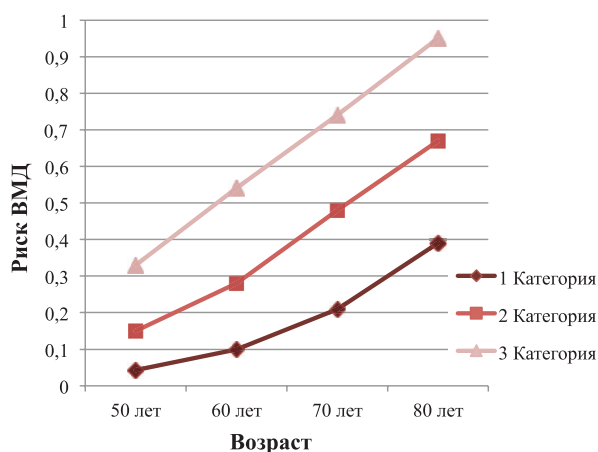
Частоты полиморфизмов генов ARMS2/HTRA1 и CFH rs1061170 были значительно выше в группе больных поздней ВМД ($p < 0.05$). Статистически значимое увеличение риска поздней стадии ВМД в нашем исследовании было выявлено для полиморфизмов генов ARMS2/HTRA1 (OR = 2,81, ДИ = [1,33-5,93], $p = 0,006$) и CFH rs1061170 (OR = 2,17, ДИ = [0,98-4,82], $p = 0,048$). Курение также было связано с высоким риском поздней ВМД: OR = 2,57, ДИ = [1,36-4,84], $p = 0,004$.

4. Построение статистической модели для оценки риска прогрессирования ВМД

Построение статистической модели для прогнозирования вероятности поздней стадии ВМД также проводилось с применением логистического регрессионного анализа. В результате анализа были отобраны предикторы и составлено уравнение логистической регрессии. Значения переменных и коэффициентов уравнения представ-

Таблица 2. Переменные и коэффициенты уравнений логистической регрессии

Параметр	Регрессионный коэффициент (β)	Значение p	Значения X
Модель оценки индивидуального риска ВМД			
const	-4,11	$p=0,045$	1
ARMS2/HTRA1	1,022	$p<0,001$	GG/GG=0, GT/GA=1, TT/AA=2
CFH rs1061170	0,659	$p=0,002$	TT=0, TC=1, CC=2
CFH rs1329428	0,447	$p=0,036$	AA=0, AG=1, GG=2
MT-ND2	0,712	$p=0,045$	A=0, G=1
Возраст (годы)	0,89	$p<0,001$	50-60=0, 60-70=1, 70-80=2, >80=3
Модель оценки риска поздней стадии ВМД			
const	-5,21	$p=0,040$	1
ARMS2/HTRA1	1,03	$p=0,006$	GG/GG=0, GT/GA=1, TT/AA=2
CFH rs1061170	0,77	$p=0,050$	TT=0, TC=1, CC=2
Курение	0,94	$p=0,004$	Никогда=0, редко=1, да=2



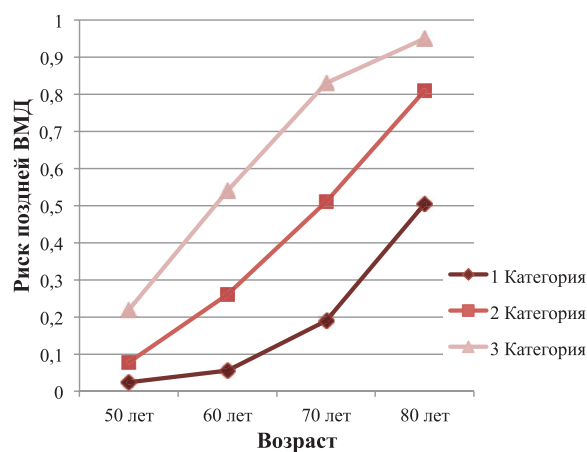
Категория	Риск ВМД	Медиана и интервал
1	Среднепопуляционный	4% (1,6-9,1%)
2	Высокий	15% (9,2-22,9%)
3	Очень высокий	33% (23-70,2%)

Рисунок 2. Зависимость риска ВМД от возраста по категориям.

лены в таблице 2. Вероятность поздней стадии ВМД рассчитывалась по описанной ранее формуле. Для данной модели AUC = 0,73, что говорит о хорошем качестве составленной модели. Чувствительность теста составила 66,7%, специфичность — 78,3% (рис. 1). Для стратификации риска поздней ВМД все возможные значения уравнения логистической регрессии также сгруппированы в 3 категории, определен интервал вероятности и медиана (рис. 3).

5. Оценка зависимости фенотипа ВМД от клинических и генетических факторов

Полиморфизм гена комплемента CFH rs1061170 значительно повышает риск поздней стадии ВМД. Поми-



Категория	Риск ВМД	Медиана и интервал
1	Среднепопуляционный	2% (0,5-3,7%)
2	Высокий	8% (3,8-15,3%)
3	Очень высокий	21% (15,4-58%)

Рисунок 3. Зависимость риска поздней стадии ВМД от возраста по категориям.

мо этого, нами отмечена тенденция к большей связи этого полиморфизма с географической атрофией, чем с экссудативной формой ($p = 0,04$ и $0,42$, соответственно). Таким образом, данный полиморфизм, вероятно, предрасполагает к течению поздней ВМД преимущественно по неэкссудативному пути. Полиморфизм гена C3 также встречался чаще у больных с ГА ($p = 0,037$). Частота этого полиморфизма не отличалась в группах ВМД и контроля, но была значительно выше среди больных с географической атрофией. Полученные данные о связи полиморфизмов генов системы комплемента с ГА согласуются с данными зарубежных исследований и подтверждают предположение о важной роли системы ком-

плементы в патогенезе неэкссудативной формы ВМД [5]. Отмечена тенденция к связи полиморфизмов генов ARMS2/HTRA1 с экссудативной формой ВМД ($p = 0,045$). Полученные данные согласуются с результатами других исследований, показавших высокий риск экссудативной ВМД у пациентов с риск-генотипами данных полиморфизмов [6, 7].

Выявлена тенденция к более высокой распространенности хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ) среди курящих больных, чем среди некурящих ($p = 0,05$). Исследования показывают, что курение является важным фактором в патогенезе ВМД, приводит к оксидативному стрессу, снижению уровня антиоксидантов и лютеина в сетчатке, ухудшению кровотока в хориоидее и гипоксии [8]. Не было выявлено статистически значимых связей фенотипов ВМД с полом, высоким ИМТ и наличием установленного диагноза ВМД у родственников больных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты полиморфизмов генов CFH, ARMS2/HTRA1 и MT-ND2 были значительно выше в группе больных ВМД, чем в группе контроля ($p < 0,05$). Выявлено, что наличие хотя бы одной риск-аллели данных полиморфизмов увеличивает риск ВМД более чем в два раза, и риск еще выше у гомозигот. Определение многих полиморфизмов в российской популяции проводится впервые, и хотелось бы отметить выявленные нами различия. Частоты полиморфизма гена C3 rs2230199 не отличались в группе ВМД и контроля, и этот полиморфизм, вероятно, не вносит большого вклада в увеличение риска ВМД в исследуемой популяции. Определенный риск для CFH rs1061170 оказался несколько ниже, чем сообщается в европейских исследованиях [9]. Выявлено, что полиморфизмы генов ARMS2 и HTRA1 имеют полное сцепление в исследуемой группе, и данный вариант ARMS2/HTRA1

вносит большой вклад в увеличение риска ВМД [10].

Нами была построена статистическая модель для оценки индивидуального риска ВМД и для определения вероятности прогрессирования ВМД в позднюю стадию. Важно отметить, что зная генотип пациента по исследуемым полиморфизмам, мы можем предполагать наиболее вероятный вариант течения ВМД.

Определение пациентов высокого риска, их регулярное обследование будет способствовать раннему выявлению ХНВ и других осложнений. В настоящее время существуют возможности первичной профилактики ВМД для лиц из группы риска, а также возможность предотвратить переход неэкссудативной ВМД в экссудативную. В структуре как первичной профилактики ВМД, так и профилактики неоваскулярной ВМД, большое значение имеют модифицируемые факторы риска, нутрицевтивная поддержка, а также возможность превентивного медикаментозного лечения пре-экссудативной ВМД [3].

Кроме того, наличие риск-вариантов исследуемых полиморфизмов значительно влияет на эффективность терапии. Так, по данным литературы, риск-генотип CFHrs1061170 снижает эффективность анти-VEGF терапии и лечения антиоксидантами [11]. Пациенты, имеющие риск-вариант ARMS2/HTRA1, наоборот, быстрее отвечают на лечение ранибизумабом и методом фотодинамической терапии и имеют лучший результат восстановления остроты зрения [12, 13]. С другой стороны, данные гены или их продукты являются привлекательной мишенью для разработки новой, патогенетически ориентированной или генной терапии [14].

Таким образом, разработанная тест-система и математический алгоритм определения риска ВМД, риска прогрессирования ВМД имеют хорошую диагностическую информативность и перспективны для применения в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith A.F. The growing importance of pharmacoeconomics: the case of age-related macular degeneration // *Br J Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 94. – P. 1116-1117.
2. Day S.A. et al. Medicare costs for neovascular age-related macular degeneration, 1994-2007 // *Am J Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 152. – P. 1014-1020.
3. Chew E.Y., Lindblad A.S., Clemons T.A. Summary results and recommendations from the age-related eye disease study // *Arch Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 127. – P. 1678-1679.
4. Rauch R.R. et al. Time to first treatment: The Significance of Early Treatment of Exudative Age-related Macular Degeneration // *Retina.* – 2011. – Vol. 29. – P. 41-46.
5. Scholl H.P. et al. CFH, C3 and ARMS2 are significant risk loci for susceptibility but not for disease progression of geographic atrophy due to AMD // *PLoSOne.* – 2009. – Vol. 4. – P. 741-748.
6. Teper S.J., Nowińska A.E., Wylęgała E.S. A69S and R38X ARMS2 and Y402H CFH gene polymorphisms as risk factors for neovascular age-related macular degeneration in Poland – a brief report // *Med SciMonit.* – 2012. – Vol. 18. – P. 21-23.
7. Tong Y.J. et al. LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis // *Mol Vis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 1958-1981.
8. Klein M.L. et al. The Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration // *Am J Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 137. – P. 486-495.
9. Thakkinian A.K. et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration // *Hum Mol Genet.* – 2006. – Vol. 15. – P. 2784-2790.
10. Chen Y.J. et al. Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with genetic markers and environmental factors // *Arch Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 129. – P. 344-351.
11. Orlin A.M. et al. Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration // *Retina.* – 2012. – Vol. 32. – P. 4-9.
12. Kibbin M.S. et al. VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration // *Br J Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 96. – P. 208-212.
13. Tsuchihashi T.D. et al. Complement factor H and high-temperature requirement A-1 genotypes and treatment response of age-related macular degeneration // *Ophthalmology.* – 2011. – Vol. 118. – P. 93-100.
14. Zarbin M.A., Rosenfeld P.J. Pathway-based therapies for age-related macular degeneration: an integrated survey of emerging treatment alternatives // *Retina.* – 2010. – Vol. 30. – P. 1350-1367.