

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
NEUROMOKSLŲ INSTITUTAS
OFTALMOLOGIJOS LABORATORIJA

Dominyka Borisovaitė

Eksudacinės amžinės geltonosios dėmės degeneracijos sąsajos su *KCTD10* rs56209061
geno polimorfizmu

Medicinos fakultetas

Mokslinis vadovas: dr. Rasa Liutkevičienė

Kaunas, 2017

TURINYS

1. SANTRAUKA	4
2. SUMMARY	5
3. PADĖKA	6
4. INTERESŲ KONFLIKTAS	6
5. ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS	6
6. SANTRUMPOS.....	7
7. SAŲOKOS.....	8
8. ĮVADAS.....	9
9. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	10
10. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
10.1 Amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD).....	11
10.2 Paplitimas	12
10.3 Patogenezė.....	12
10.4 Genetiniai veiksniai	13
10.5 Geno KCTD10 struktūra ir funkcijos	14
11. TYRIMO METODIKA.....	15
11.1 Tyrimo planavimas.....	15
11.2 Tyrimo objektas.....	15
11.3 Tiriamųjų atranka	15
11.4 Deoksiribonukleininės rūgšties išskyrimas	16
11.5 DNR koncentracijos matavimas spektrofotometru	19
11.6 Nukleotido polimorfizmo nustatymas tikro laiko polimerazės grandinės reakcijos metodu	19
11.7 Statistinė analizė.....	21
12. REZULTATAI.....	22
12.1. <i>KCTD10</i> rs56209061 genotipų dažnis pacientų, sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje.....	22
12.2. <i>KCTD10</i> rs56209061 polimorfizmas, sergantiems pradine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje atsižvelgiant į tiriamųjų lytį.....	24

12.3. <i>KCTD10</i> rs56209061polimorfizmo sąsajos sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija amžiaus grupėse iki 65 metų, bei 65 metų ir vyresnių.....	24
13.REZULTATŲ APTARIMAS	29
14. IŠVADOS	31
15. LITERATŪROS SĄRAŠAS	32

1. SANTRAUKA

Baigiamojo magistro darbo autorė: Dominyka Borisovaitė

Baigiamojo magistro darbo pavadinimas: Eksudacinės amžinės geltonosios dėmės degeneracijos sąsajos su *KCTD10* rs56209061 geno polimorfizmu.

Vadovė: Dr. Rasa Liutkevičienė

Amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD) - tai geltonosios dėmės pažeidimas, dėl kurio ženkliai ir negrįžtamai prarandamas centrinis matymas. Iki šiol AGDD etiopatogeneziniai veiksniai nėra visiškai aiškūs. Manoma, kad AGDD etiologija yra daugiaveiksnė ir ligos išsivystymą lemia ne tik žmogaus ir aplinkos ypatybės, bet ir genetiniai veiksniai. Nustatyta, jog drūzas, atsirandančias ligos metu ir lemiančias tinklainės pažeidimą, sudaro apie 40 proc. lipidų. Todėl buvo pasirinktas genas *KCTD10*, kuris dalyvauja lipidų apykaitoje.

Šio tyrimo tikslas: nustatyti eksudacinės amžinės geltonosios dėmės degeneracijos sąsajas su *KCTD10* rs56209061 geno polimorfizmu.

1. Nustatyti rs56209061 genotipo dažnį pacientams, sergantiems eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija bei sveikiems tiriamiesiems.
2. Nustatyti rs56209061 genotipo polimorfizmus, sergantiems eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje priklausomai nuo lyties.
3. Nustatyti rs56209061 genotipo polimorfizmo sąsajas sergant eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija, pacientams iki 65 metų amžiaus ir 65 metų bei vyresniems.

Ištirti 267 eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija sergantys asmenys ir 318 sveikų tiriamųjų. Naudojant komercinius rinkinius iš periferinio kraujo leukocitų buvo išskirta DNR. Genotipavimas atliktas naudojant realaus laiko polimerazės grandinės reakcijos metodą. Rezultatai vertinti naudojant „IBM SPSS Statistics 20.0“ kompiuterinę programą.

Atlikę *KCTD10* rs56209061 geno polimorfizmo analizę nenustatėme statistiškai reikšmingų CC, CT ir TT genotipų sąsajų, sergant eksudacine amžinės geltonosios dėmės degeneracija (58,8 proc., 31,5 proc. ir 9,7 proc. eksudacinės AGDD grupėje vs. 59,75 proc., 33,96 proc. ir 6,29 proc. kontrolinėje grupėje, atitinkamai, $p=0,287$).

Atlikus dvinarę logistinę regresiją moterims, skirtingo amžiaus grupėse, nenustatėme genotipų galinčių padidinti ar sumažinti galimybę susirgti eksudacine AGDD. Tačiau analizuojant vyrus skirtingo amžiaus grupėse, nustatėme, jog galimybę susirgti eksudacine AGDD jaunesnio amžiaus vyrams 5,7 karto didino C/T genotipas lyginant su C/C ir T/T genotipais kartu ($p=0,05$).

Išvada: galimybę susirgti eksudacine AGDD jaunesnio amžiaus (<65 metų) vyrams 5,7 karto didino *KCTD10* C/T genotipas ($p=0,05$).

2. SUMMARY

Author of master thesis: Dominyka Borisovaitė

Full title of master thesis: Exudative age-related macular degeneration association with *KCTD10* rs56209061 gene polymorphism.

Supervisor: PhD Rasa Liutkevičienė

Age-related macular degeneration (AMD) is disease of the macula, which significantly affects the eyesight and leads to irreversible central vision loss. The etiopathogenesis of AMD is still not clear. The etiology of age-related macular degeneration is multifactorial and the development of disease is thought to be influenced not only by environmental and body peculiarities but also by genetic factors. Macular degenerative changes occur due to formation of drusen, which contain about 40% of lipids. Due to the fact that *KCTD10* gene is involved in metabolism of lipids, it was selected for our research.

The purpose of this study is to determine the relation between the exudative age related macular degeneration and *KCTD10* rs56209061 gene polymorphism.

Objectives of the study:

1. To determine the frequency of genotypes rs56209061 polymorphisms in patients with exudative age-related macular degeneration and control group.
2. To determine the rs56209061 polymorphisms in patients with exudative age-related macular degeneration and control group, depending on gender.
3. To determine the relation of rs56209061 polymorphisms in different age groups (<65 and ≥65) of patients with exudative age-related macular degeneration.

The study enrolled 267 patients with exudative age-related macular degeneration, and healthy controls n=318. Samples of DNA from peripheral venous blood leukocytes were purified by commercial kits.

Results were assessed using the statistical analysis method of ‘‘IBM SPSS Statistics‘‘. The analysis of rs56209061 gene polymorphism did not reveal any differences in the distribution of C/C, CT, and TT genotypes between the exudative AMD group and the control group (58.8%, 31.5 % and 9.7 % in the exudative AMD group vs. 59.75%, 33.96% and 6.29%, in the control group, respectively, p=0.287).

The *KCTD10* C/T genotype in younger man group (<65 years) showed six times greater possibility to develop exudative age-related macular degeneration compared to C/C and T/T genotypes together (p=0.05).

Conclusion: The *KCTD10* C/T genotype in younger man group (<65 years) showed 5.7 folds greater possibility to develop exudative age-related macular degeneration (p=0.05).

3. PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju už pagalbą ir naudingus patarimus, ruošiant šį darbą, savo darbo vadovei dr. Rasai Liutkevičienei. Už vertingas pastabas ir pagalbą laboratorijoje dėkoju LSMU NI Oftalmologijos laboratorijos laborantei Alvitai Vilkevičiūtei.

4. INTERESŲ KONFLIKTAS

Autorei interesų konflikto nebuvo.

5. ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS

Kauno regioninis biomedicininis tyrimų etikos komitetas. Nr. P1- BE-2-13/2008. 2015-06-05. Priedas Nr. 1.

6. SANTRUMPOS

AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija

TPE – tinklainės pigmentinis epitelis

DNR – deoksiribonukleininė rūgštis

EDTA – etilendiamintetraacetatas

DTL – didelio tankio lipoproteinai

MTL – mažo tankio lipoproteinai

ApoB – apolipoproteinas B

ApoE – apolipoproteinas E

7. SĄVOKOS

Amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD) - tai su amžiumi susijęs centrinės tinklainės dalies pakenkimas, kuris sukelia žymų arba visišką centrinio matymo praradimą.

Makula – geltonoji dėmė, centrinė tinklainės dalis, kurioje yra didžiausias fotoreceptorių kiekis ir formuojasi ryškiausias matymas.

Drūzos – gelsvi, smulkūs, apvalūs židiniai, esantys AGDD pažeidimo vietose.

Brucho membrana – giliausias gyslainės sluoksnis, skiriantis ją nuo tinklainės pigmentinio epitelio.

8. ĮVADAS

Gyvenimo trukmė ilgėja ir daugelyje išsivysčiusių valstybių siekia 80 metų ir daugiau. Tačiau daugumos ilgaamžių žmonių gyvenimo kokybė žymiai nukenčia dėl su amžiumi susijusių degeneracinių ligų. Viena iš jų yra amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD) ir ji yra pagrindinė vyresnio amžiaus asmenų akumo priežastis visame pasaulyje. AGDD – tai progresuojantis centrinės regos pažeidimas, kurį sukelia degeneraciniai ir neovaskuliniai pokyčiai geltonojoje dėmėje. Remiantis Pasaulio Sveikatos Organizacijos duomenimis, 14 milijonų žmonių visame pasaulyje yra akli ar silpnaregiai būtent dėl AGDD [1].

AGDD etiologija ir patogenezė yra daugiafaktorinė, apimanti metabolinius, genetinius ir aplinkos veiksnius ir vis dar išlieka nevisiškai aiški. Būtent dėl šių priežasčių šiuo metu prieinami gydymo metodai nėra pakankamai efektyvūs.

Išskiriamos dvi klinikinės AGDD formos: atrofinė (sausą) AGDD, kuriai būdinga progresuojanti tinklainės pigmentinio epitelio (TPE) ir fotoreceptorių degeneracija ir eksudacinė (šlapia) AGDD, kuriai būdinga gyslainės neovaskulizacija ir skysčio kaupimasis subretininiame tarpe [2].

Tobulėjančios genetikos technologijos leidžia identifikuoti vis daugiau genų, kurie galėtų turėti įtakos eksudacinės AGDD patogenezei.

Kadangi vienas iš pagrindinių AGDD požymių yra drūzų formavimasis, kurių sudėtyje yra lipidų, didelis dėmesys AGDD patogenezės mechanizme kreipiamas į genus, kurie dalyvauja lipidų metabolizme. Remiantis atliktų mokslinių tyrimų duomenimis, nustatyta, jog *KCTD10* genas dalyvauja lipidų apykaitoje [3]. Taigi šio darbo tikslas yra nustatyti eksudacinės amžinės geltonosios dėmės degeneracijos sąsajas su *KCTD10* Rs56209061 geno polimorfizmu.

Tikimės, jog mūsų pasirinkto geno polimorfizmo sąsajos tyrimas suteiks naujos informacijos apie amžinės geltonosios dėmės degeneracijos patogenezę.

9. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas

Nustatyti eksudacinės amžinės geltonosios dėmės degeneracijos sąsajas su *KCTD10* rs56209061 geno polimorfizmu.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti rs56209061 genotipo dažnį pacientams, sergantiems eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija bei sveikiems tiriamiesiems.
2. Nustatyti rs56209061 genotipo polimorfizmus, sergantiems eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje priklausomai nuo lyties.
3. Nustatyti rs56209061 genotipo polimorfizmo sąsajas sergant eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija, pacientams iki 65 metų amžiaus ir 65 metų bei vyresniems.

10. LITERATŪROS APŽVALGA

10.1 Amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD)

Nustatyta, jog regos susilpnėjimas ar visiškas netekimas yra priskiriami trims labiausiai baimę keliančioms medicininėms būklėms, kartu su onkologinėmis bei širdies ir kraujagyslių ligomis [4].

Amžinė geltonosios dėmės degeneracija (AGDD) sukelia 8,7 proc. visų aklumų pasaulyje ir yra pati dažniausia aklumo priežastis išsivysčiusiose šalyse, ypač žmonėms, vyresniems nei 60 metų [5].

AGDD yra daugiafaktorinė, vėlai prasidedanti liga, kuriai būdingas drūzų susiformavimas tinklainėje, lėtinis uždegimas ir neurodegeneraciniai procesai centrinėje tinklainės dalyje – geltonojoje dėmėje (makuloje) [4]. Nors geltonoji dėmė užima tik 4 proc. viso tinklainės ploto, ji užtikrina ryškų matymą bei beveik 10 proc. akimirkos. Sergant AGDD, šviesai jautrūs fotoreceptoriai, esantys makuloje, yra pažeidžiami ir nefunkcionuoja, taip sukeldami įvairius regėjimo sutrikimus: nuo vaizdo iškraipymo iki visiško centrinio matymo praradimo [6].

Pagrindiniai AGDD išsivystymo ir progresavimo rizikos veiksniai yra vyresnis amžius, baltoji rasė, paveldėjimas bei rūkymas [7].

AGDD skirstoma į pradinę ir vėlyvąją formas. Pradinei (pradinė lengva ir pradinė vidutinė) AGDD būdingas drūzų formavimasis tarp tinklainės pigmentinio epitelio bei bazinės membranos bei padidėjusi ar sumažėjusi pigmentacija tinklainėje. Drūzos skirstomos į kietas ir minkštas. Jos skiriasi savo forma. Vėlyvoji AGDD skirstoma į eksudacinę (neovaskulinę) ir geografinę atrofiją. Geografinė atrofija – galutinė atrofines AGDD stadija be neovaskulizacijos. Eksudacinei AGDD būdingas naujadarių nepilnaverčių kraujagyslių augimas iš gyslainės į tinklainės pigmentinį epitelį ir subretininių tarpą – tai yra besivystanti neovaskulizacija, kuri sukelia subretinines kraujosruvas ir negrįžtamą tinklainės pažeidimą ir regos praradimą [6]. Eksudacinė AGDD sudaro 15 proc. visų AGDD sergančiųjų ir yra siejama su greičiau ir stipriau progresuojančiu regos silpnėjimu, tačiau iki 20 proc. aklumo atvejų, sukeltų AGDD, yra priskiriama atrofinei jos formai [8].

10.2 Paplitimas

Senėjant populiacijai ir daugėjant žmonių, vyresnių nei 70 m., amžinė geltonosios dėmės degeneracija tampa vis dažnesne suaugusiųjų aklos priežastimi. Tai pirmoji pagal dažnį aklos sukelti priežastis išsivysčiusiose šalyse ir trečia visame pasaulyje [9].

Apie AGDD paplitimą Lietuvoje tikslių duomenų nėra, tačiau Lietuvos valstybinės medicininės socialinės komisijos duomenimis, 2002 metais tarp pirminio regėjimo invalidumo priežasčių AGDD sudarė 13,8 proc. ir užėmė antrą vietą po glaukomos (VMSEK, 2003).

Remiantis sergančiųjų tinklainės ligomis asociacijos duomenimis, Lietuvoje sergančiųjų toli pažengusia AGDD forma yra apie 30 tūkstančių ir kasmet jų padaugėja nuo 2 iki 3 tūkstančių [10].

Jungtinėse Amerikos Valstijose pažengusia AGDD serga 1,47 proc. vyresnių nei 40 m. asmenų, ir tai sudaro 1,75 milijonus gyventojų. AGDD sergamumas didėja senstant, ir daugiau nei 15 proc. moterų, vyresnių nei 80 m., buvo randami AGDD būdingi tinklainės pokyčiai. Manoma, jog iki 2020 m. Jungtinėse Amerikos Valstijose sergančiųjų AGDD skaičius padidės dvigubai ir sieks 2,95 milijonus gyventojų [11].

Remiantis Wong WL ir bendraautorių atlikta metaanalize, žmonių, sergančių amžine geltonosios dėmės degeneracija iki 2020 m. turėtų padidėti iki 196 milijonų, o iki 2040 m. – iki 288 milijonų visame pasaulyje. To pačio tyrimo metu išryškėjo AGDD paplitimo skirtumas tarp žemynų: didesnis AGDD paplitimas nustatytas Europoje ir Šiaurės Amerikoje, o mažesnis Azijoje [5].

10.3 Patogenezė

AGDD yra multifaktorinė centrinės tinklainės dalies liga, kuri apima TPE ir Brucho membraną. AGDD būdingi kraujagyslinis, metabolinis ir uždegiminis komponentai, sukeltys antrinę tinklainės fotoreceptorių neurodegeneraciją [12].

Kasdien daug lipidų sukaupti fotoreceptoriai yra naikinami TPE ląstelių, tačiau su amžiumi Brucho membranoje dalis lipidų atsideda kaip lipoproteinai. Šie lipoproteinai yra ne iš plazmos ir jų sudėtyje yra tiek laisvo, tiek esterifikuoto cholesterolio [13]. TPE ir Brucho membrana sustorėja, nes jose kaupiasi cholesterolis ir kiti lipidai, blogėja jų pralaidumas, formuojasi ekstraląstelinės medžiagos depozitai (drūzos) tarp tinklainės pigmentinio epitelio ir Brucho membranos.

Drūzos sudarytos iš keleto skirtingos kilmės komponentų: vieni jų yra uždegime dalyvaujančios baltymų ir lipidų molekulės (komplemento aktyvatoriai, aktyvūs komplemento komponentai, komplemento sistemą reguliuojančios molekulės). Todėl manoma, kad viena iš drūzų atsiradimo priežasčių yra lėtinis uždegimas. Drūzų sudėtyje randama ir TPE ląstelių gaminamų

medžiagų bei oksiduotų molekulių, todėl AGDD patogenezei ir drūzų susiformavimui įtakos turi ir oksidacinis stresas [6]. Ląstelėse susikaupusius lipidus paveikus oksidaciniam stresui susidaro lipidų peroksidacijos produktai: 4- hidroksinonenalis (HNE) ir malondialdehidai (MDA). Šios medžiagos stabdo pasenusių išorinių fotoreceptorių segmentų lizę, todėl kaupiantis ne iki galo lizuotiems produktams rezidualinių kūnelių pavidalu yra sukeliama TPE ląstelių apoptozė [14]. Taip pat drūzų sudėtyje randama ir įprastų plazmos baltymų, įskaitant apolipoproteinus (apoE, apoB), kurių atsiradimas tarp tinklainės ir TPE aiškinamas padidėjusiu hidrostatiniu slėgiu gyslainės kapiliaruose, kurį sukelia sumažėjusi gyslainės kraujotaka [6].

Drūzos skirstomos į minkštąsias ir kietąsias. Kietosios drūzos yra dažnesnės, formuojasi tiek makuloje, tiek ir tinklainės periferijoje. Jos nedidelės, aiškiais kontūrais ir sukelia TPE atrofiją. Minkštosios drūzos yra didesnės, neaiškiais kraštais, dažniau randamos tik geltonojoje dėmėje. Jų buvimas tinklainėje siejamas su eksudacinės (neovaskulinės) AGDD formavimusi. Manoma, jog kuo didesnis drūzų (ypač minkštųjų) apimtas plotas tinklainėje, tuo didesnė AGDD rizika, nes drūzos mažina būtinų medžiagų ir deguonies iš gyslainės kraujagyslių prieinamumą, taip sukeldamos TPE ląstelių pažeidimą ir antrinį fotoreceptorių pažeidimą tinklainėje [15].

10.4 Genetiniai veiksniai

AGDD genetinė predispozicija yra aiškiai įrodyta ir genetinį ryšį pagrindžiantys tyrimai sėkmingai atskleidė keletą ryšių su liga turinčių genų lokusų [16].

Šiuo metu yra nustatytas aiškus ryšys su lokusais 1q32 (CFH) ir 10q26 (PLEKHA1/ARMS2/HTRA1), kurie koduoja komplemento faktorių H, interleukiną 8 ir su amžiumi susijusios makulopatijos baltymą 2. Vis dėlto, vien tik šių genomo regionų nepakanka, norint numatyti tikslią ligos eigą. Todėl ir toliau yra vykdomi genetiniai tyrimai, siekiant identifikuoti naujus genus, susijusius su AGDD vystymusi ir prognoze [17, 19].

Pagrindinis AGDD patogenezinio vystymosi veiksnys yra drūzų formavimasis, o drūzų sudėtyje yra apie 40 proc. esterifikuoto ir neesterifikuoto cholesterolio [20]. Davari MH ir benraautorių atliktas tyrimas parodė, jog žmonių, sergančių AGDD, serumo bendrojo cholesterolio, trigliceridų ir MTL koncentracijos buvo reikšmingai didesnės nei sveikų žmonių, tačiau DTL koncentracijos tarp grupių reikšmingai nesiskyrė [21].

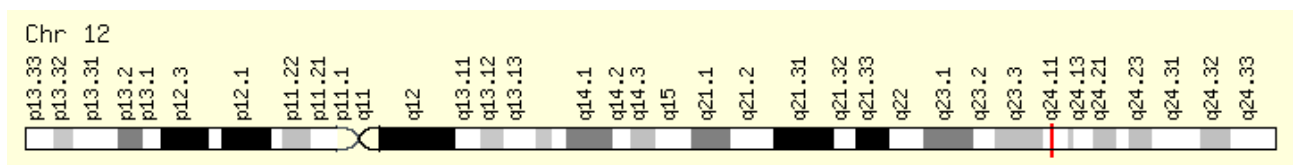
Roterdamo ir Pathologies Oculaires Liees al'Age tyrimai atrado ryšį tarp AGDD išsivystymo rizikos ir didelio tankio lipoproteinų (DTL). Klein ir kt. savo studijoje įrodė, jog didesnė DTL koncentracija kraujyje buvo susijusi su pažengusios AGDD forma – geografine atrofija. Tuo tarpu

Ebrahimi KB ir bendraatorių duomenimis nustatė sąsajas tarp DTL ir neovaskulinės (eksudacinės) AGDD [14].

Šie duomenys rodo, jog lipidų reikšmė AGDD patogenezėje yra svarbi, tačiau išlieka neaiški, ir genų, susijusių su lipidų apykaita, išsiaiškinimas galėtų būti naudingas ieškant efektyvių gydymo metodų. Todėl mūsų tyrimo pagrindinis tikslas yra nustatyti vieno geno, dalyvaujančio lipidų apykaitoje, polimorfizmo ryšį su AGDD pasireiškimu.

10.5 Geno *KCTD10* struktūra ir funkcijos

1 pav. *KCTD10* geno vieta



KCTD10 genas, priklausantis *PDIP1* genų šeimai, yra lokalizuotas 12 žmogaus chromosomoje ilgajame petyje (12q24.11). Tai baltymą koduojantis genas, dalyvaujantis įvairiuose fiziologiniuose mechanizmuose. Nustatyta, jog geno *KCTD10* rs11066782 ir rs11613718 polimorfizmai dalyvauja lipidų apykaitoje ir didina didelio tankio lipoproteinų (DTL) koncentraciją plazmoje, taip sumažindamas kardiovaskulinių ligų riziką [18].

Prieinamose informacinėse bazėse (Pubmed, Science Direct, Oxford University Press Journals Collection, Wiley Online Library, EBSCO Publishing, Lippincott Williams & Wilkins Custom, Springer Link Information Service) duomenų apie analogišką tyrimą nepavyko rasti. Kadangi dažnai straipsniuose minimi būtent genai, susiję su lipidų apykaita, nusprendėme tirti *KCTD10* rs56209061 polimorfizmą kaip galimą eksudacinės AGDD patogenezės veiksnį.

11. TYRIMO METODIKA

11.1 Tyrimo planavimas

Magistro baigiamojo darbo tyrimai atlikti LSMU Neuromokslų Instituto Oftalmologijos laboratorijoje. Planuojant magistro baigiamojo darbo tyrimus, pirmiausiai išsiaiškintas problemos aktualumas, ieškota informacijos duomenų bazėse apie eksudacinės amžinės geltonosios degeneracijos sąsajas su *KCTD10* geno, priklausančio *PDIP1* genų šeimai, polimorfizmais. Šio geno sąsajos su liga vis dar nėra aiškios. Todėl nustatysime rs56209061 polimorfizmo svarbą ligos pasireiškimui. Antrajame tyrimo planavimo etape buvo įvertintos laboratorijos techninės galimybės ir užsakyti reikalingi reagentai. Suplanavus tyrimą ir gavus reikiamus reagentus, buvo pradėti magistro baigiamojo darbo tyrimai.

11.2 Tyrimo objektas

Tyrimo metu buvo ištirtas rs56209061 geno polimorfizmas, sergantiesiems eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinei grupei.

11.3 Tiriamųjų atranka

Tyrimo metodai patvirtinti ir tyrimas pradėtas gavus Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimą (protokolo NR. P1-BE-2-13). Visi tyrime dalyvavę pacientai pasirašė informuoto asmens sutikimo formą. Tyrimo eigoje suformuotos dvi tiriamųjų grupės:

I grupė: pacientai, sergantys eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija (n=267). Grupę sudarė 168 (62,9 proc.) moterys ir 99 (37,1 proc.) vyrai.

II grupė: šią grupę sudarė 318 oftalmologiškai sveikų pacientų. Tiriamąją grupę sudarė 168 (62,9 proc.) moterys ir 99 (37,1 proc.) vyrai.

Į tyrimą pacientai buvo įtraukiami, remiantis kriterijais (1 lentelė).

1 lentelė. Įtraukimo į tyrimą kriterijai

AGDD sergančiųjų grupė	Kontrolinė grupė
1. Abiejų lyčių pacientai ≥ 50 metų, kuriems diagnozuota eksudacinė amžinė geltonosios dėmės degeneracija	1. Tiriamieji oftalmologiškai sveiki
2. AGDD diagnozė patvirtinta dviejų oftalmologų, atlikus optinę koherentinę tomografiją (OKT) arba/ir fluorescencinę angiografiją	2. Tiriamieji neserga lėtiniais ir ūmiaisiais infekciniais ir neinfekciniais susirgimais
3. Pasirašyta informuota asmens sutikimo anketa	3. Pasirašyta informuoto asmens sutikimo anketa

Eksudacinės AGDD grupės neįtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Gretutinės akių ligos (didelio laipsnio refrakcijos ydos, ragenos drumstys, lęšiuko drumstys, keratitai, glaukoma, regos nervo ligos).
2. Sisteminės ligos (cukrinis diabetas, onkologinės ligos, sisteminės jungiamojo audinio ligos, lėtinės infekcinės ligos, būklės po audinių ar organų transplantacijos).
3. Nustatyta pradinė amžinės geltonosios dėmės degeneracijos forma, kai nėra tinklainės neovaskuliarizacijos.
4. Nėra atlikta OKT ar fluorescencinės angiografijos tyrimų.

11.4 Deoksiribonukleininės rūgšties išskyrimas

Deoksiribonukleininės rūgšties (DNR) išskyrimui periferinis kraujas surinktas į vakuuminius mėgintuvėlius su etilendiamintetraacetatu (EDTA), kad nesusidarytų mikrokrešuliai ir DNR būtų apsaugota nuo degradacijos. Tyrime naudotagenominė DNR buvo išskirta iš periferinio kraujo baltųjų kraujo ląstelių – leukocitų, naudojant dviejų tipų rinkinius: „Thermo Scientific Gene JET Genomic DNA Purification Kit” ir „Thermo Scientific Mag JET Genomic DNA Kit”.

11.4.1 DNR išskyrimas naudojant silikagelio kolonėles

Naudojant rinkinį „Thermo Scientific Gene JET Genomic DNA Purification Kit” DNR buvo išskirta silikagelio kolonėlių metodu. Naudojant šį rinkinį aukštos kokybės DNR išskiriama greitai, efektyviai ir yra tinkama tolimesniems TL – PGR tyrimams. Rinkinio sudedamosios dalys:

1. Skaidymo tirpalas (Digestionsolution)
2. Lizavimo tirpalas (Lysis solution)
3. Plovimo buferis I (Washbuffer I)
4. Plovimo buferis II (Washbuffer II)
5. Eliucijos buferis (Elutionbuffer)
6. Proteinazės K tirpalas
7. RNazės A tirpalas
8. Silikagelio kolonėlės

DNR išskyrimo etapai:

1. Ląstelių lizė

Pirmiausia į sterilų, 2 ml tūrio, Eppendorf tipo mėgintuvėlį įpilama 200 µl veninio kraujo, 400 µl lizavimo tirpalo ir 20 µl proteinazės K tirpalo. Mėginys gerai išmaišomas ir inkubuojamas 10 min. 56°C temperatūroje. Lizavimo tirpalas suardo išorinę ląstelių membraną. Proteinazė K suardo ląstelės baltymus, branduolio membraną ir inaktyvuoja nukleazes, ardančias DNR.

2. DNR nusodinimas ant silikagelio kolonėlės membranos

Į lizatą įpilama 200 µl 96 proc. etanolio tirpalo, mėginys sumaišomas. Dėl sąveikos su etanolio DNR precipituoja ir negali pereiti per kolonėlės membraną, todėl lieka ant jos. Visas turinys perkeliamas į surenkamąjį mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 1 min. 6000 aps./min. greičiu. DNR prisitvirtina prie kolonėlės membranos.

3. DNR išvalymas nuo baltyminių liekanų, druskų ir reagentų, panaudotų ląstelių lizavimui

DNR išvalymui naudojami du buferiai – į kolonėlę įpilama 500 µl plovimo buferio I, mėginys centrifuguojamas 1 min. 8000 aps./min. greičiu; tada pilama 500 µl buferio II, centrifuguojama 3 min. 12000 aps./min. greičiu.

4. DNR išplovimas iš kolonėlės

Nukleorūgštis išskyrimas kolonėlėje pagrįstas adsorbicija ant kieto paviršiaus. Lizuojamos biologinio objekto ląstelės prisitvirtina ant filtrų dėl aukštos joninės jėgos chaotropinių tirpalų, o nuo filtro nuplaunamos pateikiamu buferiu. Sąveika priklauso nuo pH ir druskų, esančių eliacijos buferyje.

Įpilama 75 µl eliucijos buferio, inkubuojama 2 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min. 8000 aps./min. greičiu. Eliucijos buferyje ištirpusi DNR surenkama į kriomėgintuvėlius ir saugoma -20 C temperatūroje.

11.4.2 DNR išskyrimas naudojant magnetines daleles

Rinkinio „Thermo Scientific Gen JET Genomic DNA Purification Kit” technologija pagrįsta magnetinėmis dalelėmis, šios technologijos pagalba išskiriama aukštos kokybės DNR. Išskirta DNR tinkama naudoti tolimesniems molekuliniais tyrimams, tokiems kaip kokybinė ar TL – PGR. Rinkinio sudedamosios dalys:

1. Skaidymo tirpalas (Digestionsolution)
2. Lizavimo tirpalas (Lysis solution)
3. Plovimo buferis I (Washbuffer I)
4. Plovimo buferis II (Washbuffer II)
5. Eliucijos buferis (Elutionbuffer)
6. Proteinazės K tirpalas
7. RNazės A tirpalas
8. Magnetinės dalelės
9. Magnetinis stovėlis

DNR gryninimo etapai:

1. Ląstelių lizė

Pirmiausia į sterilų, 2 ml tūrio, Eppendorf tipo mėgintuvėlį įpilama 200 µl veninio kraujo, 200 µl skaidymo tirpalo 20 µl proteinazės K tirpalo. Mėginys gerai išmaišomas ir inkubuojamas 10 min. 56°C temperatūroje. Skaidymo tirpalas suardo išorinę ląstelių membraną. Proteinazė K suardo ląstelės baltymus, branduolio membraną ir inaktyvuoja nukleazes, ardančias DNR.

2. RNR inaktyvacija

Naudojamas RNazės A tirpalas. Į lizatą įpilama 20 µl RNazės A, gerai sumaišoma ir inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje.

3. DNR surišimas su magnetinėmis dalelėmis

Į mėginį įpilama 300 µl lizės buferio ir sumaišoma. Mėginys su lizės buferiu perpilamas į naują mėgintuvėlį, kuriame yra 400 µl 96 proc. etanolio ir 25 µl magnetinių dalelių. Mėginys vėl

sumaišomas ir įstatomas į magnetinį stovėlį, kur laikomas 3 minutes. DNR su magnetinėmis dalelėmis prikimba prie mėgintuvėlio sienelės, esančios prie magneto.

- 4. DNR išvalymas nuo baltyminių liekanų, druskų ir reagentų, panaudotų ląstelių lizavimui**
DNR išvalymui naudojami du buferiai – į mėginį įpilama 800 µl plovimo buferio I, mėginys sumaišomas; mėginys plaunamas du kartus, naudojant 800 µl plovimo buferio II. Po kiekvieno plovimo mėginys įstatomas 2 – 3 min. į magnetinį stovėlį.

5. DNR išgryninimas

Naudojamas eliucijos buferis. Į mėginį įpilama 75 µl eliucijos buferio, mėginys gerai sumaišomas ir inkubuojamas 72°C temperatūroje 5 min. Eliucijos buferyje ištirpusi DNR surenkama į kriomėgintuvėlius ir saugoma -20 C temperatūroje.

11.5 DNR koncentracijos matavimas spektrofotometru

Prieš atliekant TL – PGR, būtina išmatuoti išskirtos DNR koncentraciją, tyrimo metu ji buvo išmatuota spektrofotometru „Agilent Technologies, Cary 60 UV – Vis“. DNR, RNR, oligonukleotidų ir mononukleotidų kiekis nustatomas vandeniniuose tirpaluose, matuojant tirpalo absorbciją (optinį tankį) ultravioletinių bangų ilgyje. Nukleorūgščių nustatymas vykdomas naudojant 260 nm UV šviesos bangos ilgio spindulius. Baltyminės tirpalo priemaišos įvertinamos, išmatuojant optinių tankių santykį, esant 260 nm ir 280 nm UV šviesos bangos ilgiams. Jei DNR gryna, jos santykis turi būti apie 1,8.

11.6 Nukleotido polimorfizmo nustatymas tikro laiko polimerazės grandinės reakcijos metodu

Genų polimorfizmų tyrimai buvo atlikti tikro laiko polimerazės grandinės reakcijos metodu.

11.6.1 PGR etapai

Pirma, vyksta iniciacijos etapas, kurio metu vyksta Taqpolimerazės aktyvacija. Reakcija vykdoma 95°C temperatūroje, 10 min. Po to vyksta cikliška pasikartojantys etapai:

1. Pirmas etapas – DNR denatūracija. Šis etapas vyksta 92°C temperatūroje, 15 s. Jo metu, nutrūksta vandenilinės jungtys tarp azotinių bazių ir DNR grandinės atsiskiria viena nuo kitos.

2. Antras etapas – pradmenų hibridizacija ir elongacija vykdoma 60°C temperatūroje, 1 min. Pradmenys šio etapo metu vandenilinėmis jungtimis jungiasi prie jiems komplementarių dauginamos DNR sričių. Reakciją katalizuoja fermentas Taqpolimerazė. Šio etapo metu polimerazė sintetina komplementariąmatricinei DNR grandinę. DNR kiekis, kartojant denatūraciją, hibridizaciją ir elongaciją didėja eksponentiškai.

11.6.2 PGR principas

600 mėginių genotipavimas buvo atliekamas tikro laiko PGR gausintuvu „Rotor – Gene Q“. Genotipavimui skirti pradmenys ir molekuliniai žibukai buvo sukurti kompanijos „AppliedBiosystems“. Kiekvienai reakcijai buvo naudojama 2 µl genominę DNR (~10 ng) ir 10 µl PGR reakcijos mišinio, kurio sudėtis nurodoma 1 lentelėje. PGR vykdyta pagal 2 lentelėje aprašytas sąlygas.

2 lentelė. Realus laiko PGR mišinio paruošimas

Reagentai	1pvz., µl	76 pvz., µl
TaqMan Universal MasterMix II („AppliedBiosystems“, Lietuva)	6,25 µl	475 µl
„AppliedBiosystems“ genotipavimo rinkiniai (rs56209061)	0,625 µl	47,5 µl
Sterilus ddH ₂ O („ThermoFisherScientific“, Lietuva)	3,5 µl	266 µl
Viso (PGR mišinio)	10,375 µl	788,5 µl
DNR	2 µl	
Viso	12 µl	

3 lentelė. Optimalios genotipavimo reakcijos sąlygos, nustatant rs56209061 genotipus tikro laiko PGR gausintuvu „Rotor – Gene Q“

	Genotipavimo rinkinys	PGR sąlygų protokolai		Produkto dydis
rs56209061	“AppliedBiosystem” patentas.	95°C 10 min	40 ciklą: 92°C 15s 60°C 60s	Nenurodyta

Metodas:

1. Paruošiamas PGR mišinys 76 mėginiams.
2. Mišinys išpilstomas po 10 µl į 0,1 ml tūrio mėgintuvėlius.
3. Į 71 mėgintuvėlį įpilama po 2 µl DNR, o paskutiniame šulinėlyje, kaip neigiama kontrolė, įpilamas sterilus vanduo.
4. Mėgintuvėliai sudedami į specialų, 72 mėgintuvėliams skirtą diską ir ant jo uždedamas apsauginis žiedas.
5. Nustatoma programa vieno iš polimorfizmų nustatymui. Genotipuojant naudota „Alelių nustatymo“ programa (angl. Allelic Discrimination“).
6. Po 2,5 val. programa baigia darbą. Pagal skirtingų detektorių fluorescencijos intensyvumo santykį, programa nustato individų genotipus. Jų nustatymui naudojami fluorescenciniais VIC ir FAM dažais žymėti molekuliniai žibukai. Gauti rezultatai toliau naudojami statistiniams skaičiavimams.

11.7 Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atliekama naudojant kompiuterinę programą „IBM SPSS Statistics“. Duomenys pateikiami kaip realieji skaičiai (procentai), vidutiniai dydžiai ir standartiniai nuokrypiai (SN). Tarp dviejų nepriklausomų grupių skirtumams nustatyti naudotas Mann-Whitney U kriterijus, tarp kelių skirtingų grupių – Kruskal-Wallis H kriterijus. Sergančiųjų eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir referentinės grupės *KCTD10* geno polimorfizmo pasiskirstymo homogeniškumo palyginimui taikytas χ^2 ir Fisher vienpusio ir dvipusio kriterijų skaičiavimas. Skirtumai vertinti kaip statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

12. REZULTATAI

Tyrimo metu buvo suformuotos dvi tiriamųjų grupės. Pirmą grupę sudarė 267 eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija sergantys asmenys: iš jų 99 vyrai (37,1 proc.) ir 168 moterys (62,9 proc.), tiriamųjų amžiaus vidurkis – 75,40 metai. Kontrolinę grupę sudarė 318 asmenys, iš jų 113 vyrai (35,5 proc.) ir 205 (64,5 proc.) moterys, amžiaus vidurkis siekė 61,78 metus. Tiriamųjų charakteristika pateikta 4 lentelėje.

4 lentelė. Tiriamųjų charakteristika

Charakteristika	Tiriamieji, sergantys eksudacine AGDD n = 267	Kontrolinė grupė n = 318	P reikšmė
Vyrai, n (proc.)	99 (37,1)	113 (35,5)	0,382
Moterys, n (proc.)	168 (62,9)	205 (64,5)	
Amžius (vidurkis±SN)	75,40±7,65	61,78±12,42	<0,001

12.1. *KCTD10* rs56209061 genotipų dažnis pacientų, sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje

Buvo įvertintas *KCTD10* rs56209061 polimorfizmo dažnis pacientų, sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje (5 lentelė). Sergančiųjų eksudacine AGDD grupėje genotipų pasiskirstymas neatitiko Hardžio-Veinbergo dėsnio ($p < 0,05$). Statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant genotipų (C/C, C/T ir T/T) pasiskirstymus sergančiųjų eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėse nenustatyta ($p = 0,287$) (5 lentelė). Statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant alelių pasiskirstymus grupėse, taip pat nenustatyta ($p = 0,382$) (5 lentelė).

5 lentelė. KCTD10 rs56209061 polimorfizmo genotipų dažniai pacientų, sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje

Genas	Genotipas/ alelis	Dažnis (%)				
		Kontrolinė grupė n (proc.) (n=318)	p vertė HWE	AGDD grupė n (proc.) (n=267)	p vertė HWE	p vertė
KCTD10 rs56209061	Genotipas					
	C/C	190 (59.75)	0,383	157 (58,8)	0,005	0,287
	C/T	108 (33.96)		84 (31,5)		
	T/T	20 (6.29)		26 (9,7)		
	Iš viso	318 (100)		267 (100)		
	Alelis					
C	488 (76,7)		398 (74,5)		0,382	
T	148 (23,3)		136 (25,5)			

AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija, p vertė – reikšmingumo lygmuo, p vertė HWE – reikšmingumo lygmuo pagal Hardžio-Veinbergo dėsnį, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

Atlikta dvinarė logistinė regresija tiriamųjų, sergančių eksudacine AGDD, ir kontrolinėje grupėse statistiškai reikšmingų skirtumų neparodė (6 lentelė)

6 lentelė. KCTD10 rs56209061 genotipo dvinarės logistinės regresijos analizė

Modelis	Genotipas	GS (95 proc. PI)	p reikšmė	AIC
Kodominantinis	C/T	0,941 (0,660;1,342)	0,738	808,046
	T/T	1,573 (0,846;2,925)	0,152	
Dominantinis	C/T+T/T	1,040 (0,747;1,448)	0,816	808,476
Recesyvinis	T/T	1,607 (0,876;2,950)	0,125	808,158
Overdominantinis	C/T	0,893 (0,631;1,263)	0,521	808,118
Adityvinis	---	1,114 (0,836;1,437)	0,407	807,842

GS–galimybių santykis, AIC-akaike, p–reikšmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

12.2. KCTD10 rs56209061 polimorfizmas, sergantiems eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje atsižvelgiant į tiriamųjų lytį

Antrasis tyrimo uždavinys buvo įvertinti KCTD10 rs56209061 polimorfizmą, sergantiems eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje, atsižvelgiant į tiriamųjų lytį.

Palyginę genotipų pasiskirstymus tiek vyrų, tiek moterų grupėse statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatėme, rs56209061 genotipo pasiskirstymas lyginant sergančius vyrus su sveikais vyrais ir lyginant sergančias moteris su sveikomis moterimis nesiskyrė (7 lentelė).

7 lentelė. KCTD10 rs56209061 polimorfizmo dažnis pacientų, sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinėje grupėje, atsižvelgiant į tiriamųjų lytį

Genotipas	Vyrai		P Reikšmė	Moterys		P Reikšmė
	AGDD grupė n (proc.) (n=99)	Kontrolinė grupė n (proc.) (n=113)		AGDD grupė n (proc.) (n=168)	Kontrolinė grupė n (proc.) (n=205)	
CC (%)	56 (56,6)	69(61,06)	0,300	101 (60,1)	121(59,02)	0,457
CT (%)	35 (35,4)	39(34,51)	0,506	49 (29,2)	69(33,66)	0,207
TT (%)	8 (8,1)	5(4,42)	0,206	18 (10,7)	15(7,32)	0,167
Alelis						
C	147 (74,24)	177 (78,32)	0,324	251 (74,7)	311 (75,85)	0,717
T	51 (25,76)	49 (21,68)		85 (25,3)	99 (24,15)	

AGDD – amžinė geltonosios dėmės degeneracija, p–reikšmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

12.3. KCTD10 rs56209061 polimorfizmo sąsajos sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija amžiaus grupėse iki 65 metų, bei 65 metų ir vyresnių

Trečiasis darbo uždavinys buvo įvertinti polimorfizmo sąsajas tiriamiesiems atsižvelgiant į amžiaus grupes. Genotipų C/C, C/T ir T/T dažnių palyginimai, atsižvelgiant į amžių, pateikiami 8

lentelėje. Statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatyta, taip pat statistiškai reikšmingų kintamųjų nenustatyta ir atlikus logistinę regresiją (9 lentelė).

8 lentelė. KCTD10 rs56209061 genotipų dažniai, tiriamųjų sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinės grupės, atsižvelgiant į tiriamųjų amžių

Genotipas	<65 metai		p reikšmė	≥65 metai		p reikšmė
	AGDD grupė n (proc.) (n=24)	Kontrolinė grupė n (proc.) (n=168)		AGDD grupė n (proc.) (n=243)	Kontrolinė grupė n (proc.) (n=150)	
CC	11 (45,8)	103 (61,3)	0,112	146 (60,1)	87 (58,0)	0,381
CT	11 (45,8)	56 (33,3)	0,165	73 (30,0)	52 (34,7)	0,199
TT	2 (8,3)	9 (5,4)	0,411	24 (9,9)	11 (7,3)	0,251
Alelis						
C	33 (68,75)	262 (77,98)	0,199	365 (75,1)	226 (75,33)	1,0
T	15 (31,25)	74 (22,02)		121 (24,9)	74 (24,67)	

AGDD-amžinė geltonosios dėmės degeneracija, p-reikšmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

9 lentelė. KCTD10 rs56209061 genotipų, pagal amžiaus grupes, dvinarės logistinės regresijos analizė

Modelis	Genotipas	GS (95 proc. PI)	P reikšmė	AIC
<65				
Kodominantinis	C/T	2,181 (0,833;5,711)	0,112	126,234
	T/T	1,198 (0,221-6,501)	0,834	
Dominantinis	C/T+T/T	1,939 (0,780;4,820)	0,154	124,734
Recesyvinis	T/T	0,880 (0,172-4,502)	0,878	126,756
Overdominantinis	C/T	2,128 (0,839;5,400)	0,112	124,277
Adityvinis	---	1,405 (0,726;2,715)	0,313	125,782
≥65				
Kodominantinis	C/T	0,905 (0,562;1,456)	0,681	473,795
	T/T	1,444 (0,647;3,224)	0,369	

Dominantinis	C/T+T/T	1,000 (0,643;1,557)	0,999	473,011
Recesyvinis	T/T	1,497 (0,683;3,281)	0,314	471,964
Overdominantinis	C/T	0,862 (0,542;1,372)	0,532	472,622
Adityvinis	---	1,078 (0,773;1,504)	0,657	472,812

GS–galimybių santykis, AIC-akaike, p–reikšmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

KCTD10 rs56209061 polimorfizmo genotipų dažnių analizė, atsižvelgiant į tiriamųjų amžių ir lytį pateikta 10 ir 11 lentelėse, tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant moterų ir vyrų genotipų pasiskirstymus skirtingo amžiaus grupėse nenustatyta (10 ir 11 lentelės).

10 lentelė. *KCTD10* rs56209061 genotipų dažniai, tiriamųjų moterų sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinės grupės moterų, atsižvelgiant į amžių

Genotipas	<65 metai		p reikšmė	≥65 metai		p reikšmė
	AGDD grupė n (proc.) (n=17)	Kontrolinė grupė n (proc.) (n=125)		AGDD grupė n (proc.) (n=151)	Kontrolinė grupė n (proc.) (n=80)	
CC	8 (47,1)	72 (57,6)	0,286	93 (61,6)	49 (61,3)	0,535
CT	7 (41,2)	46 (36,8)	0,460	42 (27,8)	23 (28,7)	0,499
CC	2 (11,8)	7 (5,6)	0,293	16 (10,6)	8 (10,0)	0,541
Alelis						
C	23 (67,65)	190 (76,0)	0,296	228 (75,5)	121 (75,63)	1,0
T	11 (32,35)	60 (24,0)		74 (24,5)	39 (24,37)	

AGDD-amžinė geltonosios dėmės degeneracija, p-reikšmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

11 lentelė. *KCTD10* rs56209061 genotipų dažniai, tiriamųjų vyrų sergančių eksudacine amžine geltonosios dėmės degeneracija ir kontrolinės grupės vyrų, atsižvelgiant į amžių

Genotipas	<65 metai		p reikšmė	≥65 metai		p reikšmė
	AGDD grupė n (proc.)	Kontrolinė grupė		AGDD grupė n (proc.)	Kontrolinė grupė	

	(n=7)	n (proc.) (n=43)		(n=92)	n (proc.) (n=70)	
CC	3 (42,9)	31 (72,1)	0,136	53 (57,6)	38 (54,3)	0,396
CT	4 (57,1)	10 (23,3)	0,085	31 (33,7)	29 (41,4)	0,199
TT	0 (0)	2 (4,7)	0,737	8 (8,7)	3 (4,3)	0,217
Alelis						
C	10 (71,43)	72 (83,72)	0,273	137 (74,46)	105 (75,0)	1,0
T	4 (28,57)	14 (16,28)		47 (25,54)	35 (25,0)	

AGDD-amžinė geltonosios dėmės degeneracija, p-reiškmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

Atlikus dvinarę logistinę regresiją moterims skirtingo amžiaus grupėse, nenustatėme genotipų galinčių padidinti ar sumažinti galimybę susirgti eksudacine AGDD (12 lentelė). Analizuojant vyrus skirtingo amžiaus grupėse, nustatėme, jog galimybę susirgti eksudacine AGDD jaunesnio amžiaus vyrams beveik 6 kartus didina C/T genotipas lyginant su C/C ir T/T genotipais kartu (GS=5,729; 95 proc. PI:1,001;32,793; $p=0,05$) (13 lentelė).

12 lentelė. KCTD10 rs56209061 genotipų, moterų imties, pagal amžiaus grupes, dvinarės logistinės regresijos analizė

Modelis	Genotipas	GS (95 proc. PI)	P reikšmė	AIC
<65				
Kodominantinis	C/T	1,262 (0,388;4,104)	0,699	85,615
	T/T	0,993 (0,162;6,081)	0,994	
Dominantinis	C/T+T/T	1,193 (0,396;3,598)	0,754	83,681
Recesyvinius	T/T	0,897 (0,158;5,076)	0,902	83,764
Overdominantinis	C/T	1,264 (0,409;3,905)	0,685	83,615
Addityvinis	---	1,071 (0,484;2,368)	0,866	83,751
≥65				
Kodominantinis	C/T	0,987 (0,510;1,910)	0,969	270,208
	T/T	1,221 (0,462;3,228)	0,687	
Dominantinis	C/T+T/T	1,046 (0,576;1,900)	0,882	268,367
Recesyvinius	T/T	1,226 (0,475;3,168)	0,674	268,209
Overdominantinis	C/T	0,958 (0,503;1,824)	0,896	268,372

Addityvinis	---	1,067 (0,696;1,636)	0,765	268,300
-------------	-----	---------------------	-------	---------

GS–galimybių santykis, AIC-akaike , p–reikšmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai p<0,05.

13 lentelė. KCTD10 rs56209061 genotipų, vyrų imties, pagal amžiaus grupes, dvinarės logistinės regresijos analizė

Modelis	Genotipas	GS (95 proc. PI)	P reikšmė	AIC
<65				
Kodominantinis	C/T	5,360 (0,936;30,709)	0,059	39,590
	T/T	-	0,999	
Dominantinis	C/T+T/T	4,118 (0,757;22,388)	0,101	39,183
Recesyvinis	T/T	-	0,999	41,233
Overdominantinis	C/T	5,729 (1,001;32,793)	0,050	37,979
Addityvinis	---	2,107 (0,586;7,578)	0,254	40,676
≥65				
Kodominantinis	C/T	0,517 (0,122;2,195)	0,371	205,704
	T/T	0,446 (0,102;1,957)	0,284	
Dominantinis	C/T+T/T	0,971 (0,499;1,890)	0,931	204,924
Recesyvinis	T/T	2,052 (0,496;8,481)	0,321	203,877
Overdominantinis	C/T	0807 (0,407;1,598)	0,538	204,552
Addityvinis	---	1,097 (0,643;1,871)	0,734	204,816

GS–galimybių santykis, AIC-akaike, p–reikšmingumo lygmuo, skirtumai laikomi statistiškai reikšmingi, kai p<0,05.

13. REZULTATŲ APITARIMAS

Tyrimo rezultatai parodė, kad *KCTD10* rs56209061 polimorfizmas statistiškai reikšmingai nesiskyrė seragnatiems eksudacine AGDD lyginant su sveikų žmonių kontroline grupe (C/C 39,75 proc., C/T – 33,96 proc., T/T – 6,29 proc. kontrolinėje grupėje vs. C/C 58,8 proc., C/T – 31,5 proc., T/T – 9,7 proc. AGDD grupėje, atitinkamai). Atlikus logistinės regresijos analizę nustatėme, kad *KCTD10* rs56209061 CT genotipas buvo šešis kartus didino galimybę susirgti AGDD jauniems vyrams. Galimai *KCTD10* rs56209061 CT polimorfizmas galėtų būti kaip ligą predisponuojantis genotipas. Tiek vyrams, tiek moterims, sergančioms AGDD ir kontrolinėje grupėje dominavo C alelis. Iki 65 metų amžiaus sergančiųjų AGDD genotipas C/C ir C/T pasiskirstė po lygiai, o vyresniems negu 65 metai, sergantiems AGDD dominavo C/C genotipas. Vyrų, jaunesnių negu 65 metai amžiaus grupėje C alelis dominavo AGDD sergantiems asmenims (71,43 proc.), taip pat ir kontrolinėje grupėje (83,72 proc.). Vyresnių negu 65 metai amžiaus vyrų grupėje, tiek kontrolinėje, tiek AGDD dominavo C alelis atitinkamai 76,6 proc. ir 75 proc.

Iki šiol analogiškų tyrimų, tiriančių šio *KCTD10* geno polimorfizmus sergant AGDD, nėra. AGDD genetinė predispozicija yra aiškiai įrodyta ir genetinį ryšį pagrindžiantys tyrimai sėkmingai atskleidė ryšį su liga turinčius genų polimorfizmus: ApoE2, ApoE4, CFH Y420H, ARMS2 A69S, LIPC, LIPC, LPL, ABCA1, CETP [16, 24]. Vis dėlto, kadangi AGDD patogenezė išlieka neaiški, ir toliau yra siekiama surasti su AGDD predipozicija ir progresavimu susijusių genų polimorfizmų.

Amžinės geltonosios dėmės degeneracijos pagrindiniu patogenezės veiksnium šiuo metu laikomas drūzų formavimasis. Drūzų didžiąją dalį sudaro lipidai ir lipoproteinai, todėl tyrinėjamas lipidų apykaitos sutrikimų ir AGDD ryšys. Lipidų metabolizmą gali nulemti įvairūs genai.

Anksčiau atliktų tyrimų duomenys prieštaringi. Vieni tyrimai rodo, kad žmonių, sergančių AGDD, serumo bendrojo cholesterolio, trigliceridų ir MTL koncentracijos buvo reikšmingai didesnės nei sveikų žmonių, tačiau DTL koncentracijos tarp grupių reikšmingai nesiskyrė [21]. Kitame tyrime įrodyta, jog didesnė DTL koncentracija kraujyje buvo susijusi su pažengusios AGDD forma – geografine atrofija [29]. Tuo tarpu Hyman ir kt. savo studijoje parodė ryšį tarp DTL ir neovaskulinės (eksudacinės) AGDD [30].

KCTD10 genas yra nedaug tyrinėtas, tačiau pastaruoju metu mokslininkai ieško šio geno sąsajų ir su kitomis ligomis. Įrodyta, kad *KCTD* genų šeimos koduojami baltymai dalyvauja ląstelių proliferacijoje, diferenciacijoje, apoptozėje ir metabolizme. Nenormali *KCTD* genų reguliacija ir mutacijos yra siejamos su įvairiomis ligomis, tokiomis kaip meduloblastoma, krūties karcinoma, nutukimas, uždegiminės plaučių ligos [23]. Tyrimai parodė, kad *KCTD10* geno padidėjusi raiška nustatyta žmogaus širdyje, skeleto raumenyse, placentoje. A549 plaučių adenokarcinomos ląstelėse,

KCTD10 slopinimas mažina ląstelių proliferaciją. Chen ir kt., savo tyrime parodė, kad *KCTD10* genas gali turėti įtakos metabolizmui ir lemti nutukimą, diabetą bei aterosklerozę [28]. Taip pat šis genas yra svarbus DNR sintezėje sąveikaudamas su proliferuojančių ląstelių branduolio antigenu ir delta polimeraze [25]. Neseniai buvo atrasta, kad *KCTD10* galėtų būti naudojamas kaip virškinamojo trakto navikų prognostinis žymuo [26].

Nors nustatyta nemažai sąsajų tarp šios genų grupės genų mutacijų ir ligų, tačiau mokslinių tyrimų su mūsų pasirinktu geno *KCTD10* rs56209061 geno polimorfizmu, mūsų duomenimis, neradome.

Restrepo NA ir kt. atliko tyrimą, kuriame tyrė ryšį tarp AGDD ir 57 skirtingų atskirų nukleotidų polimorfizmų. Tyrimo metu buvo nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp AGDD ir polimorfizmo (*KCTD10/MVK* rs2338104) amerikos meksikiečių populiacijoje [27].

Ryšį tarp *KCTD10* geno ir metabolinio sutrikimo nustatė Junyent M ir kt. Jie tyrė geno *KCTD10* ir didelio tankio lipoproteinų (DTL) koncentracijos plazmoje ryšį, kuomet pacientai vartojo daug angliavandenių turintį maistą. Nustatyta, kad *KCTD10* geno atskirų nukleotidų polimorfizmai (i5642G->C ir V206VT->C) yra susiję su pakitusiomis DTL cholesterolio koncentracija plazmoje, tiksliau, buvo stebėtas DTL cholesterolio koncentracijos sumažėjimas žmonėms, vartojantiems daug angliavandenių turinčio maisto [22].

Kitame tyrime, kurį atliko Sun J. ir kt. tyrė *KCTD10* geno sąsajas su dislipidemija ir kardiovaskulinių ligų rizika [18]. Tyrime buvo nustatytos statistiškai reikšmingos sąsajos su *KCTD10* genų polimorfizmais: rs1477117, rs11066782, rs11613718, rs11615336 polimorfizmų su dislipidemija, rs11066782, rs11613718 polimorfizmų ryšys su bendro cholesterolio koncentracija ir rs1477117, rs11066782 polimorfizmų ryšys su trigliceridų koncentracija. Nustatyta, kad *KCTD10* rs11066782 ir rs11613718 polimorfizmai yra statistiškai reikšmingai susiję su aukštesnėmis DTL cholesterolio koncentracijomis serume ir mažesne kardiovaskulinių ligų rizika [18].

Vienas iš pagrindinių mūsų tyrimo trūkumų yra santykinai mažas imties dydis. Į tyrimą buvo įtraukti 585 tiriamieji: 267 AGDD sergantys pacientai ir 318 sveikų. Taigi, norint išsiaiškinti tikslesnį rs56209061 polimorfizmo vaidmenį AGDD patogenezėje, tyrimas turi būti pakartotas didesnės imties grupėje.

14. IŠVADOS

1. Tiriant rs56209061 genų polimorfizmus pacientams, sergantiems eksudacine AGDD ir kontrolinėje grupėje statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatėme ($p=0,287$).
2. Palyginę genotipų rs56209061 pasiskirstymus tiek vyrų, tiek moterų grupėse statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatėme.
3. Nustatėme, jog galimybę susirgti eksudacine AGDD jaunesnio amžiaus vyrams (<65) 5,7 karto didino C/T genotipas ($p=0,05$).

15. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS. Age-related macular degeneration - emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med.* 2006; 38(7): 450–471.
2. Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacological Reports.* 2006; 58 : 353 – 363.
3. Junyent M, Parnell LD, Lai C, Lee Y, Smith CE, Arnett DK, Tsai MY, Kabagambe EK, Straka RJ, Province M, An P, Borecki I, Ordovas JM. Novel variants at KCTD10, MVK, and MMAB genes interact with dietary carbohydrates to modulate HDL-cholesterol concentrations in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network Study. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90:686–94.
4. Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian S. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2014; 15: 151–171.
5. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2014; 2(2):e106-16.
6. Joseph C, Bok BD. *The retina and its disorders.* Elsevier/Academic Press, San Diego, CA. 2011; pp. 830–836.
7. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. *Age-Related Macular Degeneration.* *N Engl J Med.* 2008;358:2606-17.
8. Sunness JS. The natural history of geographic atrophy, the advanced atrophic form of age-related macular degeneration. *Molecular Vision.* 1999; 5:25.
9. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ.* 2004; 82: 844–851.
10. Stanislovaitienė D. Klinikinių veiksnių, oksidacinio streso žymens N – karboksi(metil)lizino ir SCARB1 geno polimorfizmo sąsajos su amžine geltonosios dėmės degeneracija ir išemine širdies liga. *Daktaro disertacija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas,* 2013.
11. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B; Tomany SC, McCarty C, de Jong PTVM, Nemesure B, Mitchell P, John Kempen J, Congdon N. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:564-572.
12. Pikuleva AI, Curcio CA. Cholesterol in the retina: the best is yet to come. *Prog Retin Eye Res.* 2014 ; 10: 64-89.
13. Klein R, Myers CE, Buitendijk GHS, Rochtchina E, Gao X, de Jong PTVM, Sivakumaran TA, Burlutsky G, McKean-Cowdin R, Hofman A, Iyengar SK, Lee KE, Bruno H. Stricker BH, Johannes R. Vingerling JR, Mitchell P, Klein BEK, Klaver CCW, Wang JJ. Lipids, Lipid Genes and Incident Age-

- Related Macular Degeneration: The Three Continent Age-Related Macular Degeneration Consortium. *Am J Ophthalmol*. 2014 September ; 158(3): 513–524.
14. Ebrahimi KB, Handa JT. Lipids, Lipoproteins, and Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Lipids*, vol. 2011, Article ID 802059.
 15. Rudolf M, Clark ME, Chimento MF, Li CM, Medeiros NE, Curcio CA. Prevalence and morphology of druse types in the macula and periphery of eyes with age-related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49: 1200–1209.
 16. Sobrin, Lucia et al. Heritability and Genome-Wide Association Study to Assess Genetic Differences between Advanced Age-related Macular Degeneration Subtypes. *Ophthalmology*. 2012; 119 (9): 1874 – 1885.
 17. DeAngelis MM, Silveira AC, Carr EA, Kim IK. Genetics of Age-Related Macular Degeneration: Current Concepts, Future Directions. *OcularSemin Ophthalmol*. 2011 May; 26 (3): 77–93.
 18. Sun J, Qian Y, Jiang Y, Chen J, Dai J, Jin G, Wang J, Hu Z, Liu S, Shen C, Shen H. Association of KCTD10, MVK, and MMAB polymorphisms with dyslipidemia and coronary heart disease in Han Chinese population. *Lipids in Health and Disease*. 2016; 15:171 – 190.
 19. Cascella R, Ragazzo M, Strafella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F et al. Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes. *J Ophthalmol*. 2014; 2014:582842.
 20. Wang YF, Han Y, Zhang R, Qin L, Wang MX et al. Abundant lipid and protein components of drusen. *PLoS One*. 2010; 5: e10329.
 21. Davari MH, Gheitasi H, Yaghoobi G, Heydari B. Correlation between serum lipids and age-related macular degeneration: a case-control study. *J Res Health Sci*. 2012; 13: 98–101.
 22. Junyent M, Parnell LD, Lai CQ, Lee YC, Smith CE, Arnett DK, Tsai MY, Kabagambe EK, Straka RJ, Province M, An P, Borecki I, Ordovás JM. Novel variants at KCTD10, MVK, and MMAB genes interact with dietary carbohydrates to modulate HDL-cholesterol concentrations in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network Study. *Am J Clin Nutr*. 2009 Sep;90(3):686-94.
 23. Liu, Z., Xiang, Y. & Sun, G. The KCTD family of proteins: structure, function, disease relevance. *Cell Biosci* (2013) 3: 45.
 24. Cougnard-Grégoire A, Delyfer MN, Korobelnik JF, Rougier MB, Goff M, Dartigues JF et al. Elevated high-density lipoprotein cholesterol and age-related macular degeneration: the alienor study. *PLoS One*. 2014; 9(3):e90973.
 25. Ren K, Yuan J, Yang M, Gao X, Ding X, Zhou J, Hu X, Cao J, Deng X, Xiang S, Zhang J. KCTD10 is involved in the cardiovascular system and Notch signaling during early embryonic development. *PLoS One*. 2014 Nov 17;9(11):e112275.
 26. Kubota D, Yoshida A, Tsuda H, Suehara Y, Okubo T, Saito T, Orita H, Sato K, Taguchi T, Yao T, Kaneko K, Katai H, Kawai A, Kondo T. Gene expression network analysis of ETV1

reveals KCTD10 as a novel prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor. *PLoS One*. 2013 Aug 19;8(8):e73896.

27. Restrepo NA, Spencer KL, Goodloe R, et al. Genetic Determinants of Age-Related Macular Degeneration in Diverse Populations From the PAGE Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014;55(10):6839-6850.

28. Chen Y, Zhu J, Lum PY, Yang X, Pinto S, MacNeil DJ, et al. Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease. *Nature*. 2008;452(7186):429–35.

29. R. Klein, B. E. Klein, S. C. Tomany, and K. J. Cruickshanks, “The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study,” *Ophthalmology*, vol. 110, no. 6, pp. 1273–1280, 2003

30. L. Hyman, A. P. Schachat, Q. He, and M. C. Leske, “Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration: Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group,” *Archives of Ophthalmology*, vol. 118, no. 3, pp. 351–358, 2000