

ӘОЖ 575.224.4; 575.1; 616.8

Б.Б. Жусипова, О.Х. Хамдиева, Р.Е. Амзеев, Н.Б. Ахматуллина*

ҚР БҒМ ҒК «Жалпы генетика және цитология институты», Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: nazken1@gmail.com

Глаукомамен ауыратын науқастарда цитохром р450 генінің полиморфизмін зерттеу

Глаукома – көру функциясының бұзылысымен, көздің көрмеуіне әкелетін көз ауруларының арасында кең таралған түрі. Глаукома ауруының адамда дамуы себептерінің бірі – ол тұқымқуалаушылық. Біріншілік ашық бұрышты глаукома (БАБГ) кезінде көру қабілетін сақтау үшін негізгі фактор ретінде ерте диагностика өте маңызды. Бұл жұмыста БАБГ 63 науқас пен бақылау тобы 25 адам зерттелді. Глаукоманың тұқымқуалайтын түрінің дамуымен ассоциацияланған цитохром генінің Р450 полиморфизмі анықталды. Қазақстанда кездесу жиілігі 46% құрады.

Түйін сөздер: Глаукома, генетика, мутация, цитохром, ПТР, РФПУ талдау.

Б.Б. Жусипова, О.Х. Хамдиева, Р.Е. Амзеев, Н.Б. Ахматуллина

Изучение полиморфизма в гене цитохром Р450 у больных глаукомой

Глаукома – одно из распространенных глазных заболеваний, приводящих людей к нарушению зрительных функций, а также к слепоте. Одним из факторов развития глаукомы является наследственность. Диагностика на ранних стадиях является одним из ключевых факторов сохранения зрения у больного с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ). Исследовано 63 пациентов с ПОУГ и группа контроля составила 25 человек. Выявлен полиморфизм гена цитохром Р450, ассоциированный с развитием наследственной формы глаукомы. Частота встречаемости составила 46% в Казахстане.

Ключевые слова: глаукома, генетика, мутация, цитохром ПЦР, ПДРФ-анализ

B.B. Zhusipova, O.Kh. Khamdiyeva, R.E. Amzeyev, N.B. Akhmatullina

Polymorphism study of cytochrome P450 gene in patients with glaucoma

Glaucoma – one of the widespread eye diseases bringing people to violation of visual functions, and also to a blindness. One of factors of development of glaucoma is heredity. Diagnostics at early stages is one of key factors of preservation of sight at the patient with primary open-angle glaucoma (POAG). 63 patients with POAG are investigated and the group of control made 25 people. Polymorphism gene cytochrome P450 associated with development of a hereditary form of glaucoma is revealed. Frequency of occurrence made 64% in Kazakhstan.

Key words: glaucoma, genetics, mutation, PCR, RFLP analysis

Қазіргі таңда көз ауруларының ішінде кең етек алып отырған «Глаукома» ауруы. «Глаукомамен күрес қоғамдарының бүкіл әлемдік қауымдастығы» мен «Глаукомамен ауыратын адамдардың бүкіләлемдік қауымдастығы» аталмыш аурумен күреске қалың бұқараның назарын аудару және аурудың таралуын азайту мақсатында игі бастаманы қолға алып отыр [1]. «Глаукома» деген термин көздің ішкі қысымының тұрақты түрде немесе оқтын-оқтын көтерілуімен, кейінірек кеңістігінде өзіне тән мүкістіктердің пайда болуымен, көру жітілігінің

төмендеуімен және көру нерві дискісінде экскавациямен семудің пайда болуымен сипатталатын организмдегі көз ауруларының түрін білдіреді. Көздің қан тамырлары мен оған келетін жүйкелер қызметінің бұзылуынан көз сұйықтығының циркуляциясы нашарлап, көзден жас шығу қиындайды. Соның нәтижесінде көзде сұйықтық жиналып, көз ішілік қысымның жоғарылауы туындайды [1-2]. Дүние жүзінде көзі көрмейтін науқастар арасында глаукомамен ауыратындардың саны 5 млн асады. Әртүрлі авторлардың мәліметтеріне жүгінсек 67-105 млн

аса адам глаукомамен ауырады, ал бүкіл дүние жүзілік денсаулық сақтау ұйымының пайымдауынша олардың саны 2030 жылға қарай екі есеге артады деп болжануда. Глаукома кезінде көру функциясы өз қабілетін жояды, осыған байланысты дер кезінде емдеу және диагноз қою өте маңызды. Глаукоманы диагностикалау және терапия шараларын қолданудың қажеттілігі соңғы 20 жыл ішінде глаукомамен ауыратын науқастардың 27%-дан жоғарысы бір көзінен көрмейтін болып қалатындығын, олардың 9%-да екі көзінің де көрмей қалуы, гипотензивті емдеуде 4,4 %, ал емдеу шаралары жүргізілмеген жағдайда 9% толық көрмеушілікке алып келетіндігі байқалды [3].

Бүгінгі таңда глаукоманың дамуына әсер ететін бірнеше гендер зерттеліп, талқыланды. Олар: цитохром P450 1B1 (CYP1B1), миоцилин (MYOC), оптиневрин (OPTN) және WDR36 гендері. Соңғы әдебиеттердегі мәліметтер бойынша цитохром P450 1B1 (CYP1B1) генінің полиморфизмі мен глаукома ауруының арасындағы байланыстарды зерттеу өзекті мәселелерінің бірі болып отыр, өйткені глаукома ауруының туындауында көз ішілік қысымының артуына, сонымен қатар жасуша ішілік ақаулығына алып келетін цитохром P450 генінде пайда болған, нүктелік мутациялар өз кезегінде трансформациялау қызметін атқара алмайды. Соның нәтижесінде глаукома ауруы туындайды [4]. Осыған орай бұл жұмыстың негізгі мақсаты, қазақстан популяциясында глаукомамен ауыратын науқастардың цитохром геніндегі полиморфизмін генетикалық негізде талдаумен кездесу жиілігін анықтау. CYP1B1 гені цитохром P450 тобына жатады, ол адам және тышқан геномында шамамен 58- ден 102 ж.н. орналасқан функциональды ген.

Цитохром P450 гені 2-ші хромосомада локализацияланған және 12 м.ж.н адам геніндегі 3 экзондардың көлемдері 371, 1044 және 3707 жұп нуклеотидтерден тұрады сондай-ақ 390 мен 3032 жұп нуклеотидтерді қамтитын 2 интроннан тұрады.

CYP1B1 гені 543-аминокышқылды белок цитохром P4501B1 кодтаушы болып табылады [5]. Оның құрамында: (а) N – соңы мембрананы байланыстырушы аймақ, ол 53 аминқышқыл қалдықтарынан тұрады, (б) ілмекше (hinge) ол 10 аминқышқыл қалдықтарынан тұрады және пролин аймағына бай, (в) цитозоль-

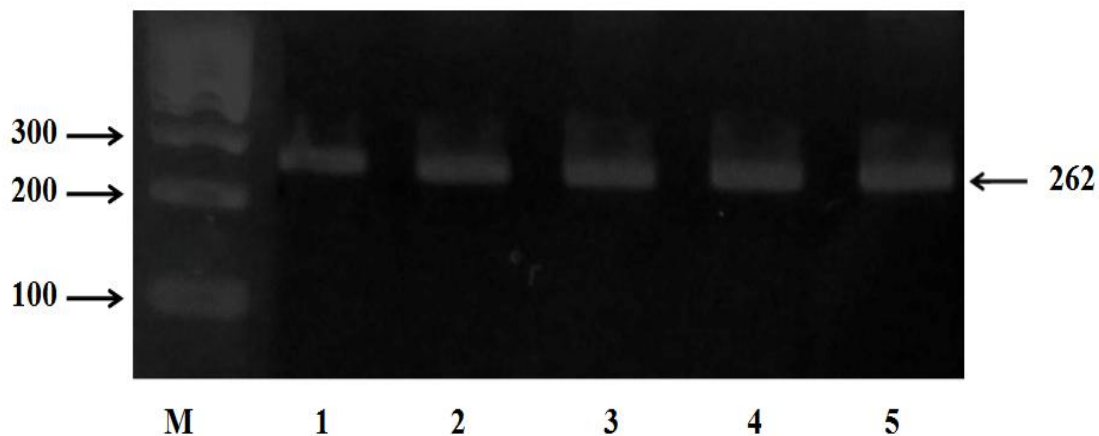
ды глобулярлы домен, оның құрамына 480 аминқышқылдарының қалдықтары кіреді [6].

P450 цитохромның мелатонин метаболизміне әсерін зерттегенде, CYP 1B1, CYP 1A2 және CYP 1B1 гендері белоктары арқылы 6 – гидроксимелатонин түзілетінін анықтаған болатын. P450 1B1 цитохром глаукома патогенезінде осы белоктың қатысуы мелатонин деградация үрдісінде маңызды рөл атқаруы мүмкін, себебі, мелатонин үшін рецепторлар көздің көптеген құрамындағы (қарашық, қасаң, қабақта, склерада, хорноидте, фото рецепторларда, торшаның қанды тамырларында, сондай – ақ целиарлы денешіктің эпителиі) кездеседі. Осы рецепторлардың қасаң қабақ пен целиарит денешіктердің өсінділерінде болуы, секрециясына және КІҚ циркадты ритмінің өзгеруіне мелатониннің қатысуы арқылы жүреді деген болжамды тудырады [7-8]. Дегенмен де, кейін аса КІҚ мелатониннің әсеріне жүргізілген зерттеулер кері нәтиже берді (зертханалық жануарларға жүргізілген тәжірбие кезінде мелатониннің әсерінен КІҚ төмендеуі де, жоғарылауы да байқалды), сондықтан бұл заттың глаукоманың пайда болуына әсері туралы осы кунге дейін нақты деректер жоқ. Chambers әріптестерімен CYP 1B1 цитохром ретиноидты қышқыл өндірген кезінде алкоголь дегидрогеназа және альдегидрогеназаның әсерін толықтыруы мүмкін және дегидрогеназа түзілмейтін ұлпалардағы жалғыз фермент бола алады деген пікірлерін білдірді [9]. Ретиноидты қышқыл А дәруменінен түзіледі, ересектерде көптеген ұлпаларды жасушалық ажырату үрдісінде және эмбриональды даму кезінде іргелі рөл атқарады, осының нәтижесінде көзішілік қысымының жоғарылауы артып, аурудың басты патогенезіне алып келеді [10].

Басқа да жіктеу бойынша P450 цитохром: (а) жоғары консервативті СООН – соңғы ядро – бөлігі, бұған 4 спираль (Д Е) және J және К спиральдар, β – жапырақшалар 1 және 2, сонымен бірге ген байланыстырушы және "спиральды" аймақ және (б) NH₂ – соңғы – бұл бөлігі ілмекше аймағындағы трансмембранды доменнен тұрады [11].

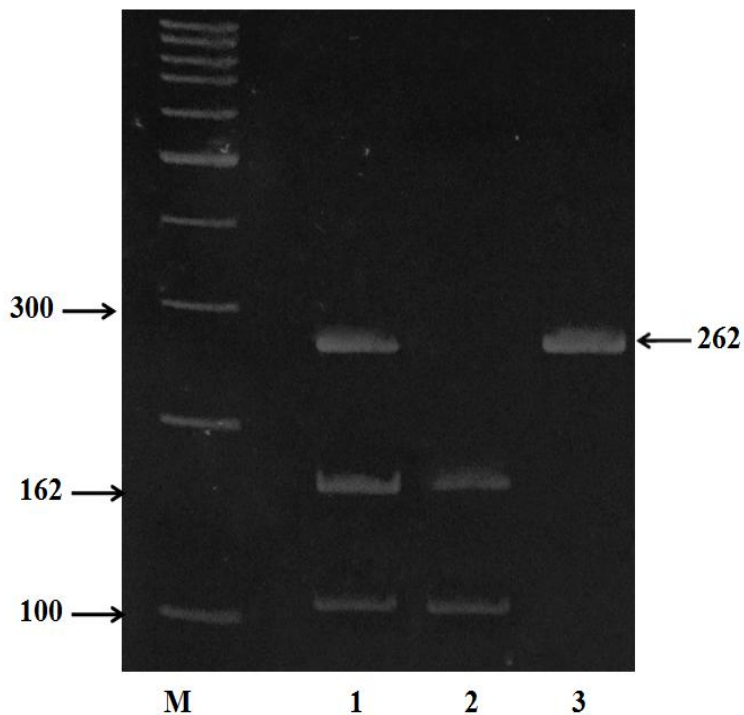
Зерттеу материалдары және әдістер.

Зерттеу жұмысымыздың барысында цитохром P450 геніндегі A119S аллельдік жағдайының генотипін анықтау үшін, глаукома диагнозы қойылған науқастардан және бақылау



М – молекулалық массасы белгілі маркер; 1, 5 – амплификат өнімдерінің үлгісі

1 сурет - A119S мутациясын анықтау үшін цитохром генінің екінші экзонына (2C1) 262 ж.н. молекулалық салмағын құрайтын ПТР амплификат өнімінің электрофореграммасы



М-молекулалық массасы белгілі маркер. 1 – гетерозиготты жағдайдағы A119S мутациясы бар науқастың ДНҚ үлгісі; 2 – A119S мутациясы жоқ науқастың ДНҚ үлгісі; 3 – гомозиготалы жағдайдағы A119S мутациясы бар науқастың ДНҚ үлгісі

2 сурет - Электрофореграмма A119S мутациясын анықтау үшін цитохром генінің екінші фрагмент 2 экзон (2C1) амплификат өнімдеріне рестрикциялық талдау

тобындағы адамдардың қаннан ДНҚ молекуласын фенол-хлороформды әдіспен бөліп алып, арнайы праймерлердің бірізділігін пайдалану арқылы полимеразды тізбекті реакция (ПТР) жүргізілді. ПТР әдісі арқылы зерттелетін геннің амплификатын алып болғаннан кейін генотиптің анықталуын жүргізу үшін рестрикциялық талдау қолданылды. Әдістің барысы, ол арнайы фермент-рестриктазаның, яғни ДНҚ-ның бөліктері арнайы түрде кесуіне негізделген. Цитохром P450 геніндегі A119S алелдік жағдайы бойынша MroNI (PdiI (NaeI) рестриктазасы қолданылды. Амплификацияланған генді рестриктазамен өңдегеннен кейін, алынған фрагменттерді электрофорез арқылы полиакриламидті геледе бөлдік. ПААГ концентрациясы 8% құрайды. Амплификация өнімдерімен 20 мкл ерітінді алып оған 5 мкл 2 х бояғыш қосып, ПААГ-нің ұяшықтарына құйылды. Алынған фрагменттерге баға беру үшін молекулалық массасы 100 bp маркер қолданылды. Гель бромды этидий (10мкг/мл) ерітіндісінде боялды және ультракүлгін сәулесінде суретке түсірілді.

Зерттеу нәтижелерімен оларды талқылау

Зерттеу жұмысына негізгі материал ретінде Алматы қаласындағы көз аурулар ғылыми – зерттеу институтындағы глаукома диагнозы қойылған науқастардың қаны қолданылды. Перифериялық қан үлгілерінен ДНҚ молекула-

сын бөліп алу стандартты фенол-хлороформды әдіспен жүзеге асырылды. Ары қарай бөлініп алынған ДНҚ молекуласына полимеразды тізбекті реакция қойылды.

БАБГ ауыратын 29 науқастың цитохром генінің 2-ші экзон 2СІ фрагментінде Pdi (NaeI) рестрикция эндонуклеазасы арқылы ферментативті гидролиз өнімін алу нәтижесінде A119S мутациясы алынды.

Суретте глаукома диагнозы қойылған науқастардың ДНҚ үлгісінің эндонуклеаздық электрофореграммасы көрсетілген; 1 – ұзындығы 262 ж.н., 162 ж.н. және 100 ж.н. фрагменттерін (кесіндінің) құрайтын гетерезиготталы жағдайдағы A119S мутациясы бар екендігін (Ala/Ser) көрсетеді; 2-мутациясы болмаған жағдайда 162 ж.н., 100 ж.н. екі фрагментке бөлінді; 3-ұзындығы 262 ж.н. құрайтын гомозиготталы мутантты аллель барын көрсетті.

Осы нәтижелерге қарап, цитохром A119S (Ala/Ser) генінің адам популяциясында мутантты варианттарының таралу жиілігі басым, ал қалыпты аллелінің таралу жиілігі аз шамада кездесті. Бұрын зертханада жүргізген зерттеулерімізде БАБГ ауыратын 29 науқаста осы мутация түрі кездескен болатын, ал оның біріншілік глаукоманың барлық формасымен ауыратын науқастарды кездесу жиілігі 46%-ке тең болды.

Әдебиет

- 1 А.А. Булгакова Жабық бұрышты глаукома // Денсаулық. – 2011. №7. С. 30-32.
- 2 Рахманов В.В., Никитина Н.Я., Захарова Ф.М. и др. Мутации и полиморфизмы генов миоцилина и оптиневрина как генетические факторы риска развития первичной открытоугольной глаукомы // Генетика. 2005. – Т.41. – №11. – С. 1567-1574
- 3 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1996. Weinreb R. // Международный конгресс по глаукоме, Сингапур. – 2007
- 4 Нестеров А.П. Первичная глаукома. М.: Медицина, 1995. – 288с.
- 5 Страхов В.В. Эссенциальная гипертензия глаза и первичная глаукома: автореф. дисс. д-ра мед. наук. Ярославль, 1997. – 26 с.
- 6 Алексеев И.Б. Врожденная глаукома // Офтальмология национальное руководство. М., 2008.- С. 699.
- 7 Kaur K., Mukhopadhyay A. Myocilin gene implicated in primary congenital glaucoma // clinical Genetics. -2005. -Vol. 67. – P. 335-340
- 8 Tamm E.R., Russell P., Epstein D.L. et al. Modulation of myocilin /TIGR expression in human trabecular meshwork // Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. – 1999. – Vol. 40. – P. 2577-2582.
- 9 Kirstein L., Cvecl A., Chauhan B.K. et al. Regulation of human myocilin/TIGR gene transcription in trabecular meshwork cells and astrocytes: role of upstream stimulatory factor // Genes. Cells. – 2000. – Vol.5. – P. 661-676.
- 10 Shepard A.R., Jacobson N., Fingert J.H. et al. Delayed secondary glucocorticoid responsiveness of the glaucoma gene myocilin in human trabecular meshwork cells // Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. – 2001. – Vol. 42. – P. 3173-3181.
- 11 Chalasani M.L., Radha V., Gupta V. et al. A glaucoma- associated mutant of optineurin selectively induces death of retinal ganglion cells which is inhibited by antioxidants // Invest. Ophthalm. Vis. Sci. -2007. -Vol. 48. -P. 1607-1614

References

- 1 A.A. Bulgakova Zhabyk buryshy glaukoma // Densaulyk. – 2011. №7. С. 30-32.
- 2 Rakhmanov V.V., Nikitina N.Ya., Zakharova F.M. i dr. Mutatsii i polimorfizmy genov miotsillina i optinevrina kak geneticheskiye faktory riska razvitiya pervichnoy otkrytougolnoy glaukomy // Genetika. 2005. – Т.41. – №11. – С. 1567-1574
- 3 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. 1996. Weinreb R. // Mezhdunarodny kongress po glaukome, Singapur. – 2007
- 4 Nesterov A.P. Pervichnaya glaukoma. M.: Meditsina, 1995. – 288s.
- 5 Strakhov V.V. Essentsialnaya gipertenziya glaza i pervichnaya glaukoma: avtoref. diss. d-ra med. nauk. Yaroslavl, 1997. – 26 s.
- 6 Alekseyev I.B. Vrozhdannaya glaukoma // Oftalmologiya natsionalnoye rukovodstvo. M., 2008.- S. 699.
- 7 Kaur K., Mukhopadhyay A. Myocilin gene implicated in primary congenital glaucoma // clinical Genetics. -2005. -Vol. 67. – P. 335-340
- 8 Tamm E.R., Russell P., Epstein D.L. et al. Modulation of myocilin /TIGR expression in human trabecular meshwork // Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. – 1999. – Vol. 40. – P. 2577-2582.
- 9 Kirstein L., Cvecl A., Chauhan B.K. et al. Regulation of human myocilin/TIGR gene transcription in trabecular meshwork cells and astrocytes: role of upstream stimulatory factor // Genes. Cells. – 2000. – Vol.5. – P. 661-676.
- 10 Shepard A.R., Jacobson N., Fingert J.H. et al. Delayed secondary glucocorticoid responsiveness of the glaucoma gene myocilin in human trabecular meshwork cells // Invest. Ophthalmol. Vis.Sci. – 2001. – Vol. 42. – P. 3173-3181.
- 11 Chalasani M.L., Radha V., Gupta V. et al. A glaucoma- associated mutant of optineurin selectively induces death of retinal ganglion cells which is inhibited by antioxidants // Invest. Ophthal. Vis. Sci. -2007. -Vol. 48. -P. 1607-1614