

**УДК: 617.7- 007.681**

Белоусова А.И., Витковский Ю.А., Логунов Н.А.,  
Комаров В.В.

## **ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА P21 КАК ФАКТОР РИСКА ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ**

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Росздрава (ректор – заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.В.Говорин)

**Введение.** Проблема глаукомы в настоящее время остается одной из наиболее актуальных в современной офтальмологии. Данная ситуация обусловлена многообразием клинических проявлений, сложностью патогенеза, трудностью ранней диагностики, а также серьезностью прогноза и медико-социальной значимостью заболевания.

Первичная открытоугольная глаукома представляет собой мультифакторное заболевание, характеризующееся развитием оптической нейропатии, гибелью клеток ретинальных ганглиев и возникновением типичных дефектов полей зрения. В настоящий момент есть все основания относить первичную открытоугольную глаукому (ПОУГ) к группе нейродегенеративных заболеваний, развивающихся на фоне апоптоза [1, 2, 14, 15].

Одним из ключевых регуляторов апоптоза является ген p53, который может координировать процесс репарации, либо индуцировать апоптоз [1,4,8, 9,10]. Полипептид p53 является модулятором транскрипции и специфически взаимодействует с ДНК, трансактивируя при этом такие гены, как p21, также известный как WAF1 (от англ. wild-type activated factor) или CIP1. Ген p21, основной эффекторный ген опухолевого супрессора p53, является мощным ингибитором циклин-зависимых киназ (cdk). Продукт гена WAF1, белок с молекулярной массой 21 kD, отвечает за остановку в фазе G1 в ответ на гиперэкспрессию p53 и повреждения ДНК. p21-WAF1 преимущественно связывается с циклин-cdk-комплексами G1- и S-фаз, но плохо связывается с циклин B-cdc2. Возможный механизм участия p21 в репликации ДНК был предложен после того, как было показано, что p21 связывается с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA) и таким образом может уменьшать процессивность ДНК-полимеразы, что приводит к переключению репликативного синтеза на репаративный [1,2, 3, 6, 7, 11].

Причиной изменения функциональной актив-

ности p21 может служить мутация (C31A) в тридцать первом кодоне: замена третьего азотистого основания, цитозина на аденин приводит к изменению аминокислотной последовательности полипептида p21, где серин заменяется на аргенин. Нестабильный или модифицированный p21 изменяет активность циклинзависимых киназ (cdk) в ответ на повреждения ДНК [13, 14].

По мнению ряда исследователей, существует ассоциация между полиморфизмом p21 и первичной открытоугольной глаукомой в некоторых популяциях. Замещение цитозина на аденин (C31A) в кодоне 31 гена p21 и как следствие, изменение аминокислотной последовательности, замена серина (Ser) на аргинин (Arg) в 31 позиции полипептида p21, является существенным фактором риска развития первичной открытоугольной глаукомы среди населения Китая [6, 7, 8, 14]. В то же время, у представителей европеоидной расы не установлено никакой связи между полиморфизмами p21, тяжестью течения и возрастом начала ПОУГ [4, 5].

Принимая во внимание разноречивые данные относительно наличия ассоциативной связи между полиморфизмом 31 кодона p21 и первичной открытоугольной глаукомой в различных популяциях, сложно оценить ассоциативную связь между полиморфизмом гена p21 и первичной открытоугольной глаукомой, не учитывая особенности их генофонда [8, 9, 10, 12]. Таким образом, сложившаяся ситуация ставит вопрос о необходимости изучения патогенетических механизмов апоптоза при первичной открытоугольной глаукоме и разработке новых молекулярно-генетических методов ранней диагностики этого заболевания в различных этнических группах.

**Целью** настоящего исследования стало изучение частоты проапоптотических аллельных вариантов кодона 31 гена p21 и оценка ассоциативной связи полиморфизма C31A p21 (Ser/Arg) и первичной открытоугольной глаукомы в различных этнических группах Забайкальского края.

**Материалы и методы.** Нами были обследованы 185 русских пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и 58 больных бурятской национальности. Группу контроля составили 190 русских и 60 лиц бурятской национальности, не имеющие острых и хронических заболеваний глаз на момент. Больные первичной открытоугольной глаукомой и здоровые индивидуумы прошли полное офтальмологическое обследование: биомикроскопию, периметрию (автоматический периграф "Периком"), тонометрию, визометрию, гони-

Таблица 1

Распределение полиморфизмов кодона 31 p21 среди резидентов русской национальности

	Группа пациентов, страдающих ПОУГ (n=185)	Группа контроля (n=190)
Ser/Ser	130 (70,3%)	174 (91,6%)
Ser/Arg	29 (15,7%)	15 (7,9%)
Arg/Arg	26 (14%)	1 (0,5%)

оскопию. Все больные ПОУГ имели характерные изменения диска зрительного нерва, открытый иридокорнеальный угол и типичные дефекты полей зрения.

Для получения образцов ДНК использовался буккальный эпителий больных ПОУГ и здоровых индивидуумов. Выделение ДНК проводилось с помощью набора "Минипреп", версия с магнитными частицами.

С целью выявления мутации C31A p21, приводящей к замене аминокислоты Ser на Arg в 31 позиции полипептида p21, проведена полимеразная цепная реакция. Для амплификации использовалась окрашенная реакционная смесь с горячим стартом qPCRmix-HS. Для каждого исследуемого образца: 25мкл (50нг/25мкл) ДНК смешивалось с 5мкл qPCRmix-HS, 0,4 мкМ (8мкл) каждого праймера и 25 мкл стерильной воды. Амплификация проводилась в следующем режиме: предварительная денатурация - 1цикл: 95°C, 5мин; затем последовательно 35 циклов: 94°C - 30с, 58°C - 30с, 72°C - 30с; заключительная инкубация 1цикл - 72°C. Анализ продуктов амплификации произведен методом электрофореза. Для проведения электрофореза использовался 2% агарозный гель, визуализация с помощью 1% бромистого этидия в ультрафиолетовом свете.

Оценка полученных данных, определение частот аллельных вариантов и генотипов проведены согласно пропорции Харди-Вейнберга и тесту Фишера.

**Результаты и обсуждение.** Группа обследуемых русской национальности состояла из 185 больных ПОУГ и включала 95 мужчин и 90 женщин, средний возраст которых составил 54 года (интервал 48-78). Группу контроля состояла из 190 человек: 97 мужчин и 93 женщины, средний возраст - 52 года (интервал 45-56).

Группа обследуемых бурятской национальности, страдающих ПОУГ включала 27 мужчин и 31 женщину, их средний возраст составил 52 года (интервал 48- 62). Группа контроля представлена 28 мужчинами и 32 женщинами, средний возраст в этой группе - 52 лет (интервал 40-56). Сред-

Таблица 2

Распределение полиморфизмов кодона 31 p21 среди резидентов бурятской национальности

	Группа пациентов, страдающих ПОУГ (n = 58)	Группа контроля (n = 60)
Ser/Ser	39 (67,2%)	44 (73,4%)
Ser/Arg	14 (8,7%)	11 (18,3%)
Arg/Arg	5 (24,1%)	5 (8,3%)

нее внутриглазное давление составило в группе русских: 22,8 мм для страдающих ПОУГ, 19,2 мм - для группы контроля. Среди лиц бурятской национальности: 19,9 и 23,2 соответственно.

Полученное распределение генотипов в группе русских обследуемых приведено в таблице 1.

В группе русских пациентов, страдающих ПОУГ распределение генотипов следующее: 130 Ser гомозигот (70,3%), 29 Ser/Arg гетерозигот (15,7%), 26 Arg гомозигот (14%). В группе контроля выявлено: 174 Ser гомозиготы (91,6 %), 15 Ser/Arg гетерозигот (7,9 %), 1 Arg гомозигота (0,5 %). Частота аллели Arg среди больных ПОУГ:  $q = 0,22$ , в группе контроля:  $q = 0,04$ , частоты генотипов Arg/Arg в данных группах: 0,048 и 0,0016 соответственно.

Распределение генотипов среди лиц бурятской национальности представлено в таблице 2.

В группе пациентов бурятской национальности распределение генотипов имеет следующий вид: 39 Ser гомозигот (67,2%), 14 Ser/Arg гетерозигот (8,7%), 5 Arg гомозигот (24,1%). В группе контроля выявлено: 44 Ser гомозиготы (73,4%), 11 Ser/Arg гетерозигот (18,3 %), 5 Arg гомозигот (8,3 %).

Частота аллели Arg среди больных ПОУГ:  $q = 0,21$ , в группе контроля:  $q = 0,18$ , частоты генотипов Arg/Arg в группах: 0,044 и 0,0324 соответственно.

Данные частот аллельных вариантов приведены в таблице 3.

Принимая во внимание разноречивые данные относительно наличия ассоциативной связи между полиморфизмом 31 кодона p21 и первичной открытоугольной глаукомой в различных этнических группах, проведенное нами исследование охватывает представителей европеоидной и монголоидной расы, проживающих на территории Забайкальского края. Частота встречаемости Arg аллели значительно выше среди больных первичной открытоугольной глаукомой ( $q = 0,22$ ) по сравнению со здоровыми резидентами ( $q = 0,04$ ) в русской этнической группе. В бурятской популяции в целом Arg аллель встречается чаще, чем

Таблица 3  
Частоты аллельных вариантов среди больных ПОУГ и здоровых индивидуумов в различных этнических группах

Частоты аллельных вариантов	Русские		Буряты	
	Больные ПОУГ	Группа контроля	Больные ПОУГ	Группа контроля
Ser	0,78	0,96	0,79	0,82
Arg	0,22	0,04	0,21	0,18

в русской, что может вносить свой вклад в распределение генотипов как среди больных ПОУГ ( $q = 0,21$ ), так и среди здоровых индивидуумов ( $q = 0,18$ ). Учитывая значительное различие в распределении генотипов и частоте Arg аллели в группе русских больных ПОУГ и здоровых индивидуумов, можно рассматривать C31A p21 (Ser/Arg) мутацию как фактор риска первичной открытогоугольной глаукомы прежде всего для представителей русской этнической группы, в то время как для лиц бурятской национальности такая взаимосвязь остается сомнительной.

Исходя из того, что дальнейшие исследования наследственности глаукомы будут направлены на открытие новых генов, мутаций, ассоциированных с ними фенотипов, и формирование базы данных полиморфизмов, которая может использоваться для диагностических и терапевтических целей, необходимо учитывать генетическую гетерогенность различных популяций. Выявление спектров патогенных мутаций, специфичных для отдельных географических и этнических групп, может быть полезно не только для прогнозирования результатов проводимых исследований, но и для поиска новых путей ранней диагностики первичной открытогоугольной глаукомы.

## ЛИТЕРАТУРА

- Курышева Н. И. Лечение глаукомы: современные аспекты и различные взгляды на проблему // Глаукома. - 2004. - № 3. - С.57 - 68.
- Туйчибаева Д.М., Худайбердиев А.Р., Махкамова Ш.Г. Прогнозирование частоты распространенности глаукомы в Республике Узбекистан// Вестник Офтальмологии. - 2004. - № 3.- С. 47 - 48.
- Anderson D., Hendrikson A. Effect of intraocular pressure on rapid axonal transport in monkey optic nerve // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 1994. - Vol.13. - P.771-783
- Dimasi D. P., Hewitt A. W., Green C. M. et al. Lack of association of p53 polymorphisms and haplotypes in high and normal tension open angle glaucoma // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. - 2006. - Vol.15. - P. 2475-2482.
- Hewit A. W., Dimasi D. P., Mackey D. A. et al. A Glaucoma Case-control Study of the WDR36 Gene D658G sequence variant // Investigative Ophthalmology and Visual Science. - 2006. - Vol.47. - P.2542-2546.
- Kim H. S., Park C. K. Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program // Brain Res. - 2005. - Sep. 28. - P.1057-1064.
- Lester M., Mardin C., Budde W. et al. Discriminant analysis formulas of optic nerve head parameters measured by Confocal Scanning Laser Tomography // J. Glaucoma. - 2002.- Vol. 11.- P. 97-104.
- Lin H.J., Chen W.C., Tsai F.J. et al. Distributions of p53 codon 72 polymorphism in primary open angle glaucoma // Br. J. Ophthalmol. - 2002. - Vol.7. - P. 767-770.
- Lin H. J., Tsai F. J., Shi Y.R., Hsu Y. et al. Association of tumour necrosis factor alpha - 308 gene polymorphism with primary open-angle glaucoma in Chinese // Science. - 1997. - Vol. 275. - P. 668 - 670.
- Nickells R. W. Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death // Surv. of Ophthalmol. 1999. - Jun .43. - Suppl.1. - P.51-61.
- Park B. C., Tibudan M., Samaraweera M. et al. Interaction between two glaucoma genes, optineurin and myocilin // Genes to Cells. - 2007. - Vol. 10. - P. 769-789.
- Popa D.P., Albu C.C., Popescu L.E. Genetic considerations in chronic simple glaucoma // Oftalmology. - 1998.- Vol. 42.- No. 1.- P. 26-30.
- Tezel G. TNF-a and TNF-a Receptor-1 in the Retina of Normal and Glaucomatous Eyes // Ophthalmol Vis Sci. - 2001. - Vol. 42. - P. 1787-1794.
- Thomas R., Philip G. G., Sharon M. K. et al. A polymorphism at codon 31 of gene p21 is not associated with primary open angle glaucoma in Caucasians // Exp. Eye Res. - 2005. - Vol.22. - P. 8493-8500.
- Turacli M.E., Aktan S.G., Sayli B.S., Akarsu N. Therapeutic and genetical aspects of congenital glaucomas // Int. Ophthalmol. - 1992. - Vol. 16. - P. 359-362.