

*Р. Е. ӘМЗЕЕВ, О. Х. ХАМДИЕВА, Б. Б. ЖҮСІПОВА, Н. П. ҚАБЫШЕВА,  
М. А. АХМЕТОВ, Н. Б. АХМАТУЛЛИНА, С. Б. ЗАЙПАНОВА, М. Х. БАЙМҰХАМЕДОВА*

(ҚР БҒМ ҒК «Жалпы генетика және цитология институты» РМК, Алматы қ.)

## **ГЛАУКОМАМЕН АУЫРАТЫН НАУҚАСТАРДЫҢ МИОЦИЛИН ГЕНІНДЕГІ МУТАЦИЯЛАРДЫ ЗЕРТТЕУ**

### **Аннотация**

Зерттеу жұмысы барысында глаукомамен ауыратын науқастарда миоцилин (МҮОС) геніндегі G367R, Q368X және G399V мутацияларының кездесу жиілігі анықталды. Глаукомамен ауыратын 60 науқас және бақылау тобындағы 20 дені сау адамның қан үлгілерінен біріншілік ашық бұрышты глаукомамен (БАБГ) ауыратын бір науқастан G367R мутациясы табылды.

**Кілт сөздер:** глаукома, мутация, миоцилин, цитохром, оптиневрин.

**Ключевые слова:** глаукома, мутация, миоцилин, цитохром, оптиневрин.

**Key words:** glaucoma, mutation, miotsilin, cytochrome, optinevrin.

Қазіргі таңда Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының мәліметі бойынша, көздің көрмеу-шілігіне алып келетін аурулардың ішінде глаукома ауруы екінші орынды иеленуде. «Глаукома» деген термин сөзі – 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 үлкен бір тобын қамтиды. Көздің қан тамырлары мен оған келетін жүйкелер қызме-тінің бұзылуынан көз сұйықтығының циркуляциясы нашарлап, көзден жас шығу қиындайды. Соның нәтижесінде сұйықтық жиналып, көзішілік қысымның жоғарылауына әкеледі [2-5, 7]. Қазіргі таңда глаукоманың дамуына қатысты 8 ген байқалды, олар моногенді глаукоманың 13 но-зоологиялық түрлерінің дамуына әкеледі. Қазақстанда глаукоманың тұқым қуалайтын түрлерінің генетикалық табиғаты жайында зерттеу жұмыстары жүргізілмеген. Олар: миоцилин (МҮОС) оптиневрин (OPTN), цитохром P450 1B1 (CYP1B1) және WDR36 гендері.

Зерттеу жұмысымыздың басты мақсаты – глаукомамен ауыратын науқастарда миоцилин (МҮОС) геніндегі G367R, Q368X және G399V мутациялардың кездесу жиілігін анықтау.

МҮОС гені бірінші хромосоманың ұзын иығында орналасқан және ол массасы 58 қДа болатын миоцилин 504-аминоқышқыл белогын кодтайды (шамамен 20 м.ж.н) жұп негізді

өлшемдері 604, 126 және 782-ден 3 экзоннан, 2 интрон және промоторлы аймақ (шамамен 5 м.ж.н); гормонды реттеуші элементтерден, (соның ішінде глюкокортикостероидты гормондар (ГКГ), эстрогендер, прогестерон тиреоидты гормондар тұрады [7]. Осыған ұқсас екі элементті (106-дан 77-ге дейін жағдайда) *L. Kisjtein* әріптестерімен (2000) бөліп алды және промотордың конститутивті белсенділігін сақтап тұру үшін қажеттігін анықтады.

МҮОС генінің өнімі трабекулярлы аппараттың секреторлық белогы болып табылады, оның аминокышқыл тізбегіндегі өзгерісі трабекулярлы аппаратта жинақталуына алып келіп, көзішілік сұйықтықтың циркуляциясына кедергі туғызады. МҮОС генінің ұзындығы 2,3 м.ж.н мРНК көз құрылысының көптеген бөліктерінде: көздің қасаң қабақ эпителиі мен эндотелиінде, қасаң қабақ бөлікшесі мен қабықшасында; қабықшалы бөліктерде: қабықша каналдарының эндотелий жасушаларында, қарашық эпителиі; сыртқы қабықтың стромальды және тегіс бұлшықет жасушаларында экспрессияланады [7, 8].

Глаукоманың ең жиі кездесетін түрі біріншілік ашық бұрышты глаукома (БАБГ) Еуропа, АҚШ және Ресейде әртүрлі берілген мәліметтерге жүгінсек, осы аурудың 50-ден 70%-ке дейін құрайды. Глаукоманың таралуы жас ұлғайған сайын жоғарылай түседі. Мысалы, 40–50 жастан БАБГ ауруы 0,1%, ал 50–60 жаста – 1,5–2%, 75 және одан да жоғары жаста шамамен 10% құрайды. Батыс елдерде БТГ-нің орташа таралу деңгейі 5000–22000 жаңа туған сәбилерге – 1, ал қиыр шығыста 2500 нәрестеге – 1, (словяндық сығандарда – жағдай 1250 нәрестеге, ал Үндістанның Андрха-Прадеш аймағында 3300 сәбиге – 1 жағдайында кездеседі [6].

2002 жылы *A. Mukhopadhyay* әріптестерімен бірге миоцилин ерекше екінші құрылымға: N-соңғы аймағында (111–180 а.о) –λ-спираль және молекуланың с –соңғы аймағында β- жинақталған құрылымды (181- 504 а.о ), олар Cys 245 және–Cys 433 цистеин қалдықтарының арасында дисульфидті көпірше болатындығын көрсетті. Организмде бұл белоктың 3 изоформасы бар; олар 55 кДа (секреторлы форма), 57 және 66 кДа.

*Suzuki Y.* әріптестерімен алғашқы рет 1997 жылы БЮГ ауыратын науқастардан МҮОС генінен 3 мутация тапты. Осы күнге дейін миоцилин генінен 70-тен аса БАБГ дамуына себепші мутациялар анықталды. Бұл мутациялар 3,86% / 155/ 4107/ БАБГ ауыратын науқастар еуропаидты нәсілді, 3,30% (18 / 545) – қара нәсілді және 4,44% (36/ 810) монголоид нәсілінде кездесті [8]. БЮГ ауыратын науқастардың миоцилин геніндегі мутациялар 20-36% жағдайда отбасылық және 10–20% спорадикалық жағдайда болатындығы анықталды [10].

Осы уақытқа дейін үш нәсілге де ортақ МҮОС генінің мутациясы кездескен жоқ. G252R, G367R және P370L мутациялары да, T293K, T377M және R352K мутациялары да еуропаидты және монголоидты нәсілдерде табылған. Атап өткен мутациялардың барлығы (76%) популяциялық және этникалық тұрғыдан суреттеледі. Сондай-ақ, мынаны атап өткенде жөн, мутацияның бір бөлігі тек қана БАБГ ауыратын науқастарда, ал қалған бөлігі БЮГ ауыратын науқастардың жас кезінде кездеседі. Ең жиі кездесетін мутациялар Q368X (1,65%) және R46X (0,99%), бұлардың 40% осы гендегі белгілі мутацияларды құрайды.

## Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу жұмысымыздың барысында MYOC геннің (G367R, Q368X және G399V) алелдік жағдайының генотипін анықтау үшін, глаукома диагнозы қойылған науқастардан және бақылау тобындағы адамдардың қанынан ДНҚ молекуласын фенол-хлороформды әдіспен бөліп алып, арнайы праймерлердің бірізділігін пайдалану арқылы полимеразды тізбекті реакция жүргізілді. ПТР әдісі арқылы зерттелетін геннің амплификатын алып болғаннан кейін, генотиптің анықталуын жүргізу үшін рестрикциялық талдау қолданылды. Әдістің барысы, ол арнайы фермент-рестрик-тазаның, яғни ДНҚ-ның арнайы бөліктерінен арнайы түрде кесуіне негізделген. MYOC генінің G367R алелдік жағдайы бойынша BstDSI рестриктазасы, Q368X BshNI және G399V алелді жағдайына BanI рестриктазасы қолданылды. Амплификацияланған генді рестриктазмен өңдегеннен кейін алынған фрагменттерді электрофорезбен полиакриламидті геледе бөлдік. ПААГ концентрациясы 8% құрайды. Амплификация өнімдерімен 20 мкл ерітінді алып оған 5 мкл 2 x бояғыш қосып, ПААГ-нің тесікшелеріне құйдық. Алынған фрагменттерге баға беру үшін молекулалық массасы 100 bp маркер қолдандық. Гельді бромды этидий (10мкг/мл) ерітіндісінде боядық және УК-сәуле-сінде алынған үлгі суретке түсірілді.

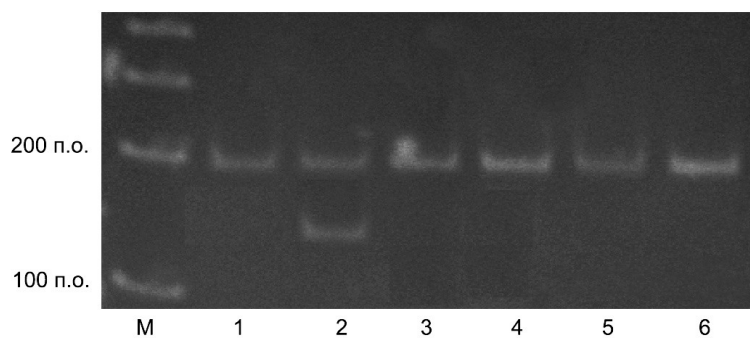
## Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

Алматы қаласының емханаларында әртүрлі офтальмологиялық патологиясымен қаралған пациенттердің ішінен глаукомаға күдікті пациенттерге зерттеу жұмыстары жүргізілді. Барлық пациенттер тонометрия, офтальмоскопия, биомикроскопия, компьютерлік периметрия, ретинальды томография т.б. тексерулерден өткізілді. Осы уақытқа дейін глаукома диагнозы қойылған 60 адамның және глаукомамен ауырмайтын бақылау тобындағы 20 адамның қан үлгілерінен ДНҚ сынамалары бөлініп алынды.

Зерттеу жұмысымыздың барысында MYOC геннің қалыпты және мутантты алелдік жағдайының генотипін анықтау үшін ПТР-талдауын жүргіздік. MYOC геніндегі мутациялардың көбі 3-ші экзонда орналасуына байланысты, зерттеуге сол экзонның 3С фрагменті таңдалып алынды. G367R, Q368X және G399V мутантты алельдерін зерттедік.

БАБГ ауыратын бір науқастың MYOC генінің үшінші экзон 3С фрагментінде ферментативті гидролиз өнімі нәтижесінде G367R мутациясы алынды (1-сурет).

Глицин GGA аминқышқылының аргиниге AGA алмасуы негізінде G367R (1099 G>A) мутациясы пайда болады. Ферментативті гидролиз негізінде ұзындығы 190 ж.н. фрагменті ұзындығы 147 ж.н. және 43 ж.н-ке тең екі фрагменттің түзілуіне алып келеді. Бұл осы рестрикция эндонуклеаз үшін сайт жоқ болып кетуіне байланысты, 1099 локусында глициннің аргининге (G→A) алмасуы



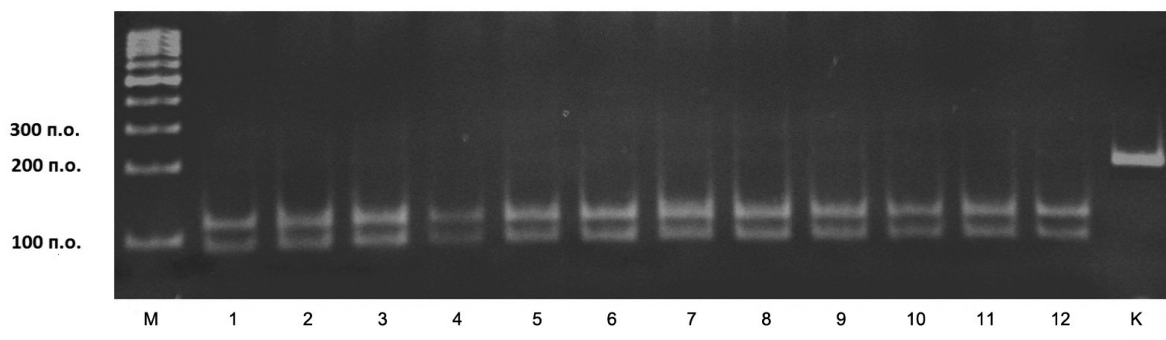
М – молекулалық массасы белгілі маркер; 2 – гетерозиготалы жағдайдағы G367R мутациясы бар

науқастың ДНҚ үлгісі; 1, 3–6 – G367R мутациясы жоқ науқастың ДНҚ үлгісі

1-сурет – Электрофореграмма G367R мутациясын анықтау үшін миоцилин генінің үшінші экзон (3с) амплификация өнімдеріне талдау

нәтижесінде соңғылықты фрагмент гидролизге ұшырамайды. Глаукома диагнозы қойылған 60 адамның MYOC генінің Gly/Gly аллелді жағдайы 59 (98,3%) адамда, ал Gly/Arg аллелді жағдайы 1 (1,66%) адамда ғана кездесті.

Суретте көрсетілгендей, 1-, 3-6, үлгілер геннің ( қалыпты ) Gly/Gly аллелдік жағдайы болатынын көруге болады, жалпы молекулалық массасы 190 bp. Ал 2-ші үлгіде зерттелген геннің (мутант-ты) Gly/Arg аллелдік жағдайын көруге болады, жалпы молекулалық массасы бұл жерде 200, 147 және 43 bp шамасында болды (ұзындығы 43 ж.н фрагменті суретте көрінбейді). Осы нәтижелерге қарап, MYOC Gly/Arg генінің адам популяциясында қалыпты варианттарының таралу жиілігі басым, ал мутантты аллелінің таралу жиілігі аз шамада кездесті. Мұндай нәтижелерді басқа да ғылыми әдебиеттерден кездестіреміз. Бұрын зертханада жүргізген зерттеулерімізде БАБГ ауыратын бір науқаста осы мутация түрі кездескен болатын, ал оның біріншілік глаукоманың барлық формасымен ауыратын науқастарды кездесу жиілігі 1,4%-не тең болды.



M – молекулалық массасы белгілі маркер; 1–12 – G399V гені бойынша мутация жоқ үлгілер; K – бақылау.

2-сурет – Электрофореграмма G399V мутациясын анықтау үшін миоцилин генінің үшінші фрагмент 3 экзон (3с) амплификация өнімдеріне рестрикциялық талдау

Рестрикциялық талдаудың нәтижесінде Q368X және G399V мутациялары тесеруден өткен глаукомамен ауыратын науқастарда табылған жоқ (2, 3-суреттер). G399V мутация бар болған жағдайда ұзындығы 199 ж.н. фрагментінде ферментативті гидролизі болмайды, ал G399V мутация болмаған жағдайда ұзындығы 104 ж.н. және 95 ж.н-ке тең екі фрагмент түзіледі.

Суретте көрсетілгендей, эндонуклеазды рестриктазамен өңделген соң барлық амплификаттар ұзындығы 104 ж.н және 95 ж.н-ке тең екі фрагментке кесілді, бұл G399V мутациясының жоқ екендігін көрсетті.

Q368X мутациясына келсек, егерде Q368X мутациясы жоқ болған жағдайда ұзындығы 81 ж.н, 44 ж.н, 35ж.н, және 30 ж.н-ке тең 4 фрагментке бөлінеді. Ал мутацияның пайда болуы бір рестрик-ция сайтының жоғалуына әкеледі, нәтижесінде ұзындықтары 81, 79 және 30 ж.н. фрагменттері түзіледі. Глаукомамен ауырмайтын бақылау тобындағы адамдарда MYOC генінің мутантты аллелді жағдайы кездеспеді.

Дегенмен алдағы зерттеу жұмысымызда G367R, Q368X және G399V мутациялары зерттелетін болады.

## ӘДЕБИЕТ

- 1 Булгакова А.А. 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 оптиневри- на как генетические факторы риска развития первичной открытоугольной глаукомы // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 11. – С. 1567-1574
- 3 Нероев В.В., Хватова А.В., Кашенко Т.П. и др. Направления развития офтальмогенетики и их практическое значение // Материалы научно-практической конференции «Вопросы офтальмогенетики». – М., 2005. – С. 3-15.
- 4 Stoilov I., Resaie T., Jansson I. et al. Expression of cytochrome P450 (Cyp1b1) during early murine development // Mol. Vis. – 2004. – Vol. 10. – P. 629-636.
- 5 Walton D.S. Congenital glaucoma // Genetic disease of the eyes. – New York, 1998. – 255 p.
- 6 Plasilova M., Feracova E., Kadasi L., Polacova V. et al. Link autosomal recessive primary congenital glaucoma to the GLC3A locus in Roms (Gypsies) from Slovakia // Hum. Hered. – 1998. – Vol. 48. – P. 30-33.

- 7 Civan M.M., Macknight A.D. The ins and outs of aqueous humour secretion // *Exp. Eye Res.* – 2004. – Vol. 78. – P. 625-631.
- 8 Stoilov I., Jansson I., Sarfarazi M. et al. Roles of cytochrome p450 in development // *Drug Metabol. Drug Interact.* – 2001. – Vol. 18. – P. 33-35.
- 9 Challa P. Glaucoma genetics // *Int. Ophthalmol. Clin.* 2008. – Vol. 48(4). – P. 73-94.
- 10 Colomb E., Kaplan J., Garchon H.J. et al Novel cytochrome p4501B1 (CYP1B1) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France // *Hum. Mut.* – 2003. – Vol. 22. – P. 496-501.
- 11 Faucher M., Anctil J.L., Rodrigue M.A. et al. Founder TIGR/myocilin mutations for glaucoma in the Quebec population // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – Vol. 11. – P. 2077-2090.
- 12 Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности». (Введение в предиктивную медицину). – СПб: Интермедика, 2000. – 272 с.
- 13 Wirtz M.K., Samples J.R., Rust K. et al. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36 // *Arch. Ophthalmol.* – 1999. – Vol. 117. – P. 237-241.
- 14 Zhuo Y., Wang M., Wey Y. Analysis of MYOC gene mutation in Chinese glaucoma family with primary open-angle glaucoma and primary congenital glaucoma // *Chinese Med. J.* – 2006. – Vol. 119(14). – P. 1210-1214.

## REFERENCES

- 1 Bulgakova A.A. Zhabyk buryshy glaucoma // *Densauyk.* 2011. – № 7. – P. 30-32.
- 2 Rahmanov V.V., Nikitina N.Ja., Zaharova F.M. i dr. Mutacii i polimorfizmy genov miocillina i optinevrina kak gene-ticheskie faktory riska razvitija pervichnoj otkrytougol'noj glaukomy // *Genetika.* – 2005. – T. 41, № 11. – S. 1567-1574.
- 3 Neroev V.V., Hvatova A.B., Kashhenko T.P. i dr. Napravlenija razvitija oftal'mogenetiki i ih prakticheskoe znachenie // *Materialy nauchno-prakticheskoy konferencii «Voprosy oftal'mogenetiki».* – M., 2005. – P. 3-15.
- 4 Stoilov I., Resaie T., Jansson I. et al. Expression of cytochrome P450 (Cyp1b1) during early murine development // *Mol. Vis.* – 2004. – Vol. 10. – P. 629-636.
- 5 Walton D.S. Congenital glaucoma. Genetic disease of the eyes. – New York, 1998. – 255 p.
- 6 Plasilova M., Feracova E., Kadasi L., Polacova V. et al. Link autosomal recessive primary congenital glaucoma to the GLC3A locus in Roms (Gypsies) from Slovakia // *Hum. Hered.* – 1998. – Vol. 48. – P. 30-33.
- 7 Civan M.M., Macknight A.D. The ins and outs of aqueous humour secretion // *Exp. Eye Res.* 2004. – Vol. 78. – P. 625-631.
- 8 Stoilov I., Jansson I., Sarfarazi M. et al. Roles of cytochrome p450 in development // *Drug Metabol. Drug Interact.* – 2001. – Vol. 18. – P. 33-35.
- 9 Challa P. Glaucoma genetics // *Int. Ophthalmol. Clin.* 2008. – Vol. 48(4). – P. 73-94.
- 10 Colomb E., Kaplan J., Garchon H.J. et al Novel cytochrome p4501B1 (CYP1B1) mutations in patients with primary congenital glaucoma in France // *Hum. Mut.* 2003. – Vol. 22. – P. 496.
- 11 Faucher M., Anctil J.L., Rodrigue M.A. et al. Founder TIGR/myocilin mutations for glaucoma in the Quebec population // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – Vol. 11. – P. 2077-2090.
- 12 Baranov B.C., Baranova E.V., Ivashhenko T.Je., Aseev M.V. Genom cheloveka i geny «predraspolozhennosti». (Vvedenie v prediktivnuju medicinu). – SPb: Intermedika, 2000. – 272 s.
- 13 Wirtz M.K., Samples J.R., Rust K. et al. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36 // *Arch. Ophthalmol.* 1999. – 117. – P. 237-241.
- 14 Zhuo Y., Wang M., Wey Y. Analysis of MYOC gene mutation in Chinese glaucoma

family with primary open-angle glaucoma and primary congenital glaucoma // Chinese Med. J. – 2006. – Vol. 119(14). – P. 1210-1214.

### Резюме

*Р. Е. Амзеев, О. Х. Хамдиева, Б. Б. Жусипова, Н. П. Кабышева,  
М. А. Ахметов, Н. Б. Ахматуллина, С. Б. Зайпанова, М. Х. Баймухамедова*

(РГП «Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, г. Алматы)

### ИЗУЧЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ МИОЦИЛИНА У БОЛЬНЫХ ГЛАУКОМОЙ

В этой работе приведены результаты исследования по выявлению мутаций G367R, Q368X и G399V гена MYOC у пациентов, страдающих глаукомой. ПЦР-анализ образцов ДНК 60 пациентов с диагнозом глаукома и контрольной группы, включающий 20 здоровых человек, показал наличие мутаций G367R у одного пациента с диагнозом первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ).

**Ключевые слова:** глаукома, мутация, миоцилин, цитохром, оптиневрин.

### Summary

*R. E. Amzeev, O. Kh. Khamdieva, B. B. Jusipova, N. P. Kabysheva,  
M. A. Akhmetov, N. B. Akhmatullina, S. B. Zaipanova, M. Kh. Baimukhamedova*

(«Institute of General Genetics and Cytology» CS MES RK, Almaty)

THE STUDY OF MUTATIONS IN THE MYOC GENE IN PATIENTS WITH GLAUCOMA

It was carried out research on identifying mutations G367R, Q368X and G399V of MYOC gene in patients with glaucoma. PCR analysis of DNA samples of 60 patients with glaucoma and control group consisting of 20 healthy people revealed G367R mutation in one patient with a diagnosis of primary open angle glaucoma (POAG).

**Key words:** glaucoma, mutation, miotsilin, cytochrome, optinevrin.

*19.03.2013 ж. мүсмі*