

УДК 617.7-007.681:575.174.015.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА С РАЗВИТИЕМ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

Кириленко М.Ю.

ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород, e-mail: 021085@list.ru

Сосудистая теория развития глаукоматозного процесса в настоящее время является наиболее распространенной. Одним из важнейших механизмов, поддерживающих кровоток в головке зрительного нерва (ГЗН) является ауторегуляция гемодинамики. Значительную роль в ауторегуляции кровообращения играет эндотелий, продуцирующий фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и инсулиноподобный фактор (IGF). Проведено исследование ассоциаций полиморфизмов эндотелиального (–460 T/C VEGF-A) и инсулиноподобного фактора роста (–G1245A IGF-1) с развитием первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ). Материалом для исследования послужила выборка из 453 индивидуумов: 252 больных первичной открытоугольной глаукомой и 191 человек контрольной группы. Анализ генетических полиморфизмов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. В результате проведенного комплексного анализа аллелей и генотипов исследуемых локусов факторов роста установлена ассоциация сочетания генотипа –1245GA IGF-1 и аллеля –460C VEGF-A с формированием предрасположенности к ПОУГ.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ), ПЦР-анализ, полиморфизм генов, эндотелиальный фактор роста (VEGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF)

RESEARCH OF POLYMORPHISMS OF GENES GROWTH FACTORS TO THE DEVELOPMENT OF PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Kirilenko M.Y.

Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: 021085@list.ru

Vascular theory of development of the glaucomatous process is currently the most common. One of the most important mechanisms for maintaining blood flow to the optic nerve head is a hemodynamic autoregulation. Significant role in the autoregulation of blood flow plays endothelium producing endothelial (VEGF) and insulin-like (IGF) growth factors. We researched an analysis of association of polymorphisms of endothelial (–460 T/C VEGF-A) and insulin-like growth factor (–G1245A IGF-1) with a predisposition to primary open-angle glaucoma (POAG). Material for the study served as a sample of 453 individuals: 252 patients with primary open-angle glaucoma and 191 people in the control group. Analysis of genetic polymorphisms was performed by polymerase chain reaction (PCR) DNA synthesis. As a result of a comprehensive analysis of alleles and genotypes studied loci of growth factors established association of genotype combinations –1245GA IGF-1 and allele –460C VEGF-A predisposition to the formation of POAG.

Keywords: primary open-angle glaucoma (POAG), PCR analysis, gene polymorphism, endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor (IGF)

Глаукома – группа хронических заболеваний глаз с различной этиологией, характеризующихся постоянным или периодическим повышением внутриглазного давления (ВГД), вызванных нарушением оттока водянистой влаги, сопровождающихся оптической нейропатией, которая проявляется атрофией зрительного нерва (с экскавацией) и характерными изменениями поля зрения [1]. Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – наиболее часто встречающаяся форма глаукоматозного процесса, составляет от 72,3 до 96,1 % всех видов глауком [2].

Предложены многочисленные теории патогенеза глаукомной оптической нейропатии (ГОН), в которых снижению кровотока, гипоксии и ишемии в головке зрительного нерва (ГЗН), т.е. сосудистым факторам отводится существенная роль [10]. Одним из важнейших механизмов, поддерживающих кровоток в ГЗН, является ауторегуляция кровообращения в питающих ее сосудах. При колебаниях перфузионного давления именно ауторегуляция контролирует гемо-

динамику. Значительную роль в ауторегуляции кровообращения играет эндотелий, продуцирующий ряд вазоактивных субстанций, среди которых наибольшее значение придается оксиду азота, эндотелину-1, фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) и инсулиноподобному фактору (IGF) [12].

Факторами роста (ФР) называют группу белковых молекул, индуцирующих синтез ДНК в клетке. Подобно гормонам эти факторы обладают широким спектром биологического действия на многие клетки – стимулируют или ингибируют митогенез, хемотаксис и дифференцировку [7]. Установлено что важная роль в этиопатогенезе ПОУГ принадлежит ФР, регулирующим деление, миграцию клеток, экспрессию белка и продукцию ряда ферментов, а также участвующим в процессах репарации, стимулируя ангиогенез и пролиферацию клеток [3]. Гены ФР обладают высокой степенью полиморфизма и ассоциированы с риском развития различных хронических заболеваний [4–6, 13, 14].

Целью нашего исследования явилось изучение ассоциаций полиморфизмов генов эндотелиального фактора роста (–460 T/C VEGF-A) и инсулиноподобного фактора роста (–G1245A IGF-1) у больных ПОУГ.

Материалы и методы исследования

Анализ полиморфизмов генов эндотелиального фактора роста (–460 T/C VEGF-A) и инсулиноподобного фактора роста (–G1245A IGF-1) проводили у 453 индивидуумов: 252 больных первичной открытоугольной глаукомой и 191 человек контрольной группы. Среди больных ПОУГ мужчин было 125 (49,6%), женщин – 127 (50,4%) ($p > 0,05$). В контрольной группе распределение по полу было следующим: мужчины – 93 человека (48,7%), женщины – 98 (51,3%) ($p > 0,05$). Средний возраст больных составил $70,53 \pm 8,43$ лет (варьировался от 46 до 89 лет), в контрольной группе – $68,55 \pm 10,57$ лет (варьировался от 48 до 87 лет) ($p > 0,05$). Таким образом, группа контроля не отличалась от группы больных ПОУГ как по полу, так и по возрасту.

Клиническое, лабораторное и инструментальное обследование индивидуумов изучаемых групп проводилось на базе офтальмологического отделения Областной клинической больницы Святого Иоасафа г. Белгорода.

Типирование молекулярно-генетических маркеров осуществлялось в лаборатории «Молекулярной генетики человека» медицинского факультета Белгородского государственного национального исследовательского университета. Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 4 мл, взятая из локтевой вены пробанда.

Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5 М раствор ЭДТА ($pH = 8,0$), тщательно перемешивали и хранили при температуре $4^{\circ}C$ не более одной недели.

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции в два этапа. На первом этапе к 4 мл крови добавляли 30 мл лизирующего буфера, содержащего 320 г сахарозы, 1% тритон X-100, 5 мл $MgCl_2$, 10 мл трис-HCl ($pH = 7,6$). Полученную смесь перемешивали и центрифугировали при $4^{\circ}C$, 4000 об/мин. в течение 20 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали. Затем прибавляли 4 мл ЭДТА-Soline, 400 мкл 10% SDS, 35 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали образец при $40^{\circ}C$ в течение 16 часов.

На втором этапе из полученного лизата последовательно проводили экстракцию ДНК равными объемами фенола, фенол-хлороформа (1:1) и хлороформа с центрифугированием при 4000 об/мин. в течение 10 минут. После каждого центрифугирования производили отбор водной фазы. ДНК осаждали из раствора двумя объемами охлажденного 96% этанола. Сформированную ДНК растворяли в бидистиллированной, деионизованной воде и хранили при $-20^{\circ}C$. Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции синтеза (ПЦР) ДНК.

Анализ генетических полиморфизмов –460 T/C VEGF-A (rs 833061) и –G1245A IGF-1 (rs35767) проводили методом ПЦР синтеза ДНК на амплификаторе CFX-96 (Bio-Rad) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров и зондов (для детекции методом TaqMan) [8, 11].

Для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди–Вайберга (HWE), использовали критерий χ^2 . Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к заболеванию судили по величине отношения шансов (OR). Рассчитывался доверительный интервал (CI) – интервал значений, в пределах которого с вероятностью 95% находится ожидаемое значение рассматриваемого параметра.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программных пакетов «STATISTICA 6.0», «Microsoft Excel 2007», «APSampler/Cygwin».

Результаты исследования и их обсуждение

Изучено распределение полиморфных маркеров генов –460 T/C VEGF-A (rs833061), –G1245A IGF-1 (rs35767) больных ПОУГ и индивидуумов контрольной группы. Результаты анализа ассоциаций данных генетических маркеров с развитием первичной открытоугольной глаукомы представлены в таблице.

Исследование распределения генотипов изучаемых полиморфных маркеров генов показало, что для всех изученных локусов в группе больных ПОУГ и в популяционной выборке эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга ($p > 0,05$). Уровень аллельного разнообразия по изученным локусам составил: от $H_0 = 0,24$ – для локуса –G1245A IGF-1 до $H_0 = 0,49$ – для локуса –460 T/C VEGF-A среди больных ПОУГ и от $H_0 = 0,31$ – для локуса – G1245A IGF-1 до $H_0 = 0,51$ для локуса –460 T/C VEGF-A в популяционной выборке.

При сравнительном анализе частот генетических вариантов исследуемых полиморфных маркеров достоверных различий между больными ПОУГ и контрольной группой не выявлено ($p > 0,05$).

В результате проведенного комплексного анализа носительства сочетаний аллелей и генотипов исследуемых локусов факторов роста с помощью программного обеспечения APSampler [15], использующего метод Монте-Карло марковских цепей и байесовскую непараметрическую статистику [9], установлена ассоциация сочетания генотипа –1245GA IGF-1 и аллеля –460C VEGF-A с формированием предрасположенности к первичной открытоугольной глаукоме. Выявлено, что среди больных ПОУГ частота данного сочетания составляет 24,89%, что в 1,5 раза превышает аналогичный показатель в контрольной группе (16,57%). Данная комбинация является фактором риска развития ПОУГ ($p = 0,03$; $OR = 1,67$, 95% CI 1,02-2,74).

Распределение генотипов, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекса фиксации полиморфных маркеров генов факторов роста среди больных ПОУГ и в контрольной группе

Локусы, показатели		Контрольная группа (n = 191)	Больные ПОУГ (n = 252)
-460 T/C VEGF-A (rs833061)	ΣN	179	244
	$N_o(N_e)$	-460 TT	48 (46,77)
		-460 TC	87 (89,46)
		-460 CC	44 (42,77)
	$\chi^2_{(HWE)} (p)$	0,13 (> 0,05)	0,08 (> 0,05)
	$H_o(H_e)$	0,49 (0,50)	0,51 (0,50)
-G1245A IGF-1 (rs35767)	ΣN	185	238
	$N_o(N_e)$	-1245 AA	9 (5,36)
		-1245 GA	45 (52,27)
		-1245 GG	131 (127,36)
	$\chi^2_{(HWE)} (p)$	3,58 (> 0,05)	0,24 (> 0,05)
	$H_o(H_e)$	0,24 (0,28)	0,31 (0,30)

Пр и м е ч а н и я : ΣN – объем выборки; N_o – наблюдаемое распределение генотипов; N_e – ожидаемое распределение генотипов; $\chi^2_{(HWE)}$ – показатель соответствия наблюдаемого распределения ожидаемому, исходя из равновесия Харди–Вайнберга; p – достигнутый уровень значимости для $\chi^2_{(HWE)}$; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность.

Выводы

Генетические полиморфизмы эндотелиального (-460 T/C VEGF-A) и инсулиноподобного фактора роста (-G1245A IGF-1) ассоциированы с формированием заболевания, комбинация генетических вариантов -1245GA IGF-1 и -460C VEGF-A является фактором риска развития первичной открытоугольной глаукомы (OR = 1,67).

Список литературы

1. Егоров Е.А. Глаукома. Национальное руководство / под ред. Е.А. Егорова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 824 с.
2. Нестеров А.П. Глаукома. – М.: Медицина, 2008. – 255 с.
3. Никитин Н.А., Кузбеков Ш.Р. Роль TGF β в офтальмологии // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 3–9.
4. Рыжков И.И. Полиморфизм генов тканевых факторов роста и его влияние на развитие и клиническое течение идиопатического сколиоза: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Белгород, 2011. – 25 с.
5. Bidwell J., Keen L., Gallager G. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. // Genes Immun. – 2001. – № 2. – P. 61–70.
6. Bloor C. A., Knight A. R., Ravindra K. Differential mRNA Expression of Insulin-like Growth Factor-1 Splice Variants in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Pulmonary Sarcoidosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2001. – Vol. 164, № 2. – P. 265–272.
7. Ching Y.-H. The Use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing / Y.-H. Ching, T. L. Sutton, Y. N. Pierpont // Journal of Plastic Surgery. – 2011. – № 11. – P. 429–449.

8. Ester W.A., van Meurs J.B., Arends N.J. The -G1245A IGF1 polymorphism is related with small head size and less brain sparing in small for gestational age born children // Eur. J. Endocrinol. – 2009. – № 160 (4). – P. 549–555.

9. Favorov A.V. A Gibbs sampler for identification of symmetrically structured, spaced DNA motifs with improved estimation of the signal length / Favorov A.V., Gelfand M. S., Gerasimova A. V. // Bioinformatics. – 2005. – № 21. – P. 2240–2245.

10. Flammer J., Orgul S., Costa V. The impact of ocular blood flow in glaucoma // Prog. Ret. Eye Res. – 2002. – № 21. – P. 359–393.

11. Ray David, Mishra Manoj, Ralph Shirley Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. // Diabetes. 2004. № 53(3). P. 861–864.

12. Resch H., Garhofer G., Fuchsjäger-Mayrl G. Endothelial dysfunction in glaucoma. // Acta Ophthalmologica. – 2009. – № 87. – P. 4–12.

13. Rivera E. J., Goldin A., Fulmer N. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine // Journal of Alzheimer's Disease. – 2005. – P. 247–268.

14. Szaflik J.P., Wysocki T., Kowalski M. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2008. – Vol. 246. – № 1. – P. 39–43.

15. APSampler, Available at: <http://sources.redhat.com/cygwin>.

References

1. Egorov E.A. Glaukoma. Nacional'noe rukovodstvo / pod red. E.A. Egorova. M.: GJeOTAR-Media, 2013. 824 p.
2. Nesterov A.P. Glaukoma. M.: Medicina, 2008. 255 p.
3. Nikitin N.A., Kuzbekov Sh.R. Rol' TGF β v oftal'mologii // Citokiny i vospalenie. 2009. T. 8, no. 1. pp. 3–9.

4. Ryzhkov I.I. Polimorfizm genov tkanevykh faktorov rosta i ego vliyanie na razvitie i klinicheskoe techenie idiopaticheskogo skolioza: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Belgorod, 2011. 25 p.
5. Bidwell J., Keen L., Gallager G. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. // *Genes Immun.* 2001. no. 2. pp. 61–70.
6. Bloor C. A., Knight A. R., Ravindra K. Differential mRNA Expression of Insulin-like Growth Factor-1 Splice Variants in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Pulmonary Sarcoidosis // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001. Vol. 164, no. 2. pp. 265–272.
7. Ching Y.-H. The Use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing / Y.-H. Ching, T. L. Sutton, Y. N. Pierpont // *Journal of Plastic Surgery.* 2011. no. 11. pp. 429–449.
8. Ester W.A., van Meurs J.B., Arends N.J. The -G1245A IGF1 polymorphism is related with small head size and less brain sparing in small for gestational age born children // *Eur. J. Endocrinol.* 2009. no. 160 (4). pp. 549–55.
9. Favorov A.V. A Gibbs sampler for identification of symmetrically structured, spaced DNA motifs with improved estimation of the signal length / Favorov A.V., Gelfand M. S., Gerasimova A. V. // *Bioinformatics.* 2005. no. 21. pp. 2240–2245.
10. Flammer J., Orgul S., Costa V. The impact of ocular blood flow in glaucoma // *Prog. Ret. Eye Res.* 2002. no. 21. pp. 359–393.
11. Ray David, Mishra Manoj, Ralph Shirley Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. // *Diabetes.* 2004. no. 53(3). pp. 861–864.
12. Resch H., Garhofer G., Fuchsjager-Mayrl G. Endothelial dysfunction in glaucoma. // *Acta Ophthalmologica.* 2009. no. 87. pp. 4–12.
13. Rivera E. J., Goldin A., Fulmer N. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine // *Journal of Alzheimer's Disease.* 2005. pp. 247–268.
14. Szaflik J.P., Wysocki T., Kowalski M. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008. Vol. 246. no. 1. pp. 39–43.
15. AR Sampler, Available at: <http://sources.redhat.com/cygwin>.

Рецензенты:

Чурносов М.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин Белгородского государственного национального исследовательского университета, г. Белгород;

Сорокина И.Н., д.б.н., профессор кафедры медико-биологических дисциплин Белгородского государственного национального исследовательского университета, г. Белгород.

Работа поступила в редакцию 15.01.2014.