

УДК 617.741-004.1-036.4 : 575.17

## Розподіл алельних варіантів промотору ( $G^{-47} \rightarrow A$ ) гену $\gamma$ -кристаліну у хворих на початкову та незрілу катаракту

С. О. Риков<sup>1</sup>, д-р мед. наук, проф., Ю. Ю. Биць<sup>1</sup>, лікар, С. В. Гончаров<sup>2</sup>, м. н. с.,  
В. Є. Досенко<sup>2</sup>, д-р мед. наук, проф.

<sup>1</sup> Київська міська клінічна офтальмологічна лікарня «Центр мікрохірургії ока»,

<sup>2</sup> Інститут фізіології ім.

О. О. Богомольця Національної Академії Наук України; Київ (Україна)

E-mail: byts.yuri@gmail.com

**Ключові слова:** кристаллін, однонуклеотидні поліморфізми, катаракта

**Ключевые слова:** кристаллин, однонуклеотидные полиморфизмы, катаракта

**Цель** — исследовать частоту полиморфизма ( $G^{-47} \rightarrow A$ ) гена  $\gamma$ -кристаллина (*rs2289917*) у больных с начальной, незрелой катарактой и у лиц без признаков помутнения хрусталика.

**Материал и методы.** Определение полиморфизма проведено с применением метода полимеразной цепной реакции с дальнейшим анализом длины рестрикционных фрагментов.

**Результаты.** По результатам генотипирования распределение алельных вариантов значительно отличается:  $G/G$  — 35,37 %  $G/A$  — 53,66 %  $A/A$  — 10,98 % у больных катарактой и  $G/G$  — 55,06 %  $G/A$  — 35,96 %  $A/A$  — 8,99 % в контрольной группе ( $p=0,03$  по критерию  $\chi^2$ ). Анализ распределения аллелей также отличает группу больных катарактой — частота минорной аллели составляла 0,38 (в контрольной группе — 0,27,  $p=0,03$ ).

**Вывод.** Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что полиморфизм в гене  $\gamma$ -кристаллина ассоциирован с развитием катаракты в украинской популяции.

## Allelic variant frequency of the promotor ( $G^{-47} \rightarrow A$ ) CRYG gene in patients with initial and immature cataract

S. A. Rykov<sup>1</sup>, Y. Y. Byts<sup>1</sup>, S. V. Goncharov<sup>2</sup>, V. E. Dosenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> «Eye Microsurgery Center»,

<sup>2</sup> «Bogomoletz Institute of Physiology»; Kiev (Ukraine)

**Key words:** crystallin, single nucleotide polymorphism, cataract.

**Purpose.** To investigate the genetical precursors of cataract development the next groups were included: patients suffering from cataract (96) and 96 healthy persons.

**Method.** The determination of gamma-crystallin polymorphism ( $G^{-47} \rightarrow A$ ) (*rs2289917*) was provided using PCR method and further analyses of restriction fragment length polymorphism.

**Results.** These allelic variants have the significant different:  $G/G$  — 35,37 %,  $G/A$  — 53,66 %,  $A/A$  — 10,98 %, and  $G/G$  — 55,06 %,  $G/A$  — 35,96 %,  $A/A$  — 8,99 % comparing with the control group ( $p=0,03$ , by  $\chi^2$ -test). Allelic frequency determination also gives us statistically significant differences between cataract patients and control — minor allele frequency 0,38 and 0,27 correspondingly,  $p=0,03$ .

**Conclusion.** Thus data received show that polymorphism of gamma-crystallin gene is associated with the cataract development in Ukrainian population.

**Вступ.** Питання про спадкову схильність до найбільш розповсюджених захворювань, у тому числі вікової катаракти, є одним з найактуальніших в сучасній медичній генетиці [14, 17, 20]. За даними ВООЗ, у світі нараховується 285 млн. людей з порушеннями зору, з яких 39 млн. сліпі. На долю людей старше 50 років припадає 82 % від загальної кількості сліпих. Серед цієї групи катаракта є основною причиною оборотної сліпоти у світі (51 % серед усіх причин сліпоти) і знаходиться на другому місці серед причин, що викликають зниження гостроти зору (33 %) [11]. Визначено основні фактори ризику цього захворювання, серед

яких найбільшу вагу мають наступні: вік, шкідливі звички, вплив ультрафіолетового випромінювання, різноманітні порушення обміну речовин, такі як цукровий діабет, тощо [1, 4, 6, 7, 9, 13, 15]. При цьому роль генетичних чинників, як правило, залишається поза увагою дослідників. За сучасними даними, спадкова схильність до усіх хронічних захворювань пояснюється наявністю в геномі людини однонуклеотидних поліморфізмів (SNPs) та інших варіацій, що впливаючи на рівень експресії,

© С. О. Риков, Ю. Ю. Биць, С. В. Гончаров, В. Є. Досенко, 2014

активності, конформації певних білкових молекул, створюють молекулярно-генетичне підґрунтя конституції людини — фенотипу, що має схильність до розвитку певних захворювань, або, навпаки, виявляє стійкість до виникнення патології [1, 3]. Слід визнати, що досліджень однонуклеотидних поліморфізмів як факторів катарактогенезу практично немає, але роль спадкових факторів в етіології цього захворювання визнається більшістю вчених [12, 16, 17]. На нашу думку, найбільш імовірним генетичним фактором, поліморфізм якого може мати відношення до розвитку катаракти, є ген  $\gamma$ -кристаліну (CRYGB), що кодує основний структуроутворюючий білок кришталика [8, 12]. Те, що генетичні альтерації (мутації) в генах кристаліну спричинюють розвиток вродженої катаракти, доведено у багатьох дослідженнях [16, 18, 19]. Так, в роботі VanderVeen et al. показано, що заміна цитозину на аденін в 109 положенні, спричиняє субституцію аргініну на цитозин в 36 положенні в білку кристаліну (CRYGD) і ця мутація виявлена в декількох родинах із спадковою катарактою [18]. Серед 21-го SNPs в гені CRYGB, аельна частота яких досліджена в різних популяціях, ми обрали один (rs2289917), базуючись на попередніх даних індійських дослідників [12].

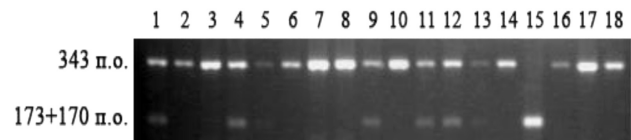
**Мета** — дослідити частоту вказаного поліморфізму CRYGB у хворих на початкову, незрілу катаракту та у людей, що не мали ознак помутніння кришталика.

### Матеріал та методи

Матеріалом дослідження був букальний епітелій 96 людей хворих на початкову та незрілу катаракту. Букальний епітелій забирався за допомогою зонду «ЗГУ-ЦМ» (Росія). Про наявність катаракти у пацієнтів досліджуваної групи робили висновок, виходячи з даних біомікроскопії переднього відрізка ока. Контрольну групу становили 96 людей, що не мали ознак вікової катаракти. ДНК виділяли з використанням наборів «Изоген» (Росія).

Визначення аельного поліморфізму промотору гена  $\gamma$ -кристаліну ( $G^{-47} \rightarrow A$ ).

$G^{-47} \rightarrow A$  поліморфізм промотору визначали методом полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP) за власною методикою. Для цього ампліфікували ділянку промотору гена  $\gamma$ -кристаліну за допомогою пари специфічних праймерів: прямий — 5'- TGT CCT CGT AGA AGG TGA TCTG -3' та зворотній — 5'- TAG AAC AAC CCG AAC СТА ССAG -3'. Праймери синтезовано фірмою «Метабіон» (Німеччина). Для ампліфікації брали 30–50 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буферу, 1,5 мМ сульфату магнію, 200 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 30 рМ кожного з праймерів і 0.5 ОД Dyeam-Taq-полімерази («АмпліСенс», Росія), об'єм довели до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері «Applied Biosystems 2700» («PerkinElmer», США). Ампліфікація фрагменту промотору складалася з 45 циклів: денатурація — 94°C (5 хв), гібридизація праймерів — 57°C (50 с), елонгація — 72°C (1 хв) та кінцева елонгація — 70°C (7 хв). У подальшому 6 мкл продукту ампліфікації інкубу-



**Рис. 1.** Результати електрофорезу фрагменту промотору гена CRYGB після рестрикції за використання ферменту PstI. Смужки 2, 3, 6–8, 10, 13, 14, 16–18 відповідають G/G-генотипу, 1, 4, 5, 9, 11, 12 — G/A-генотипу, 15 — A/A-генотипу.

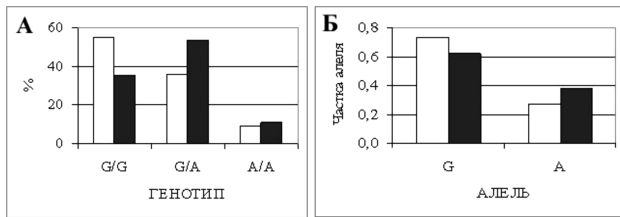
вали при 37°C протягом 18 годин з 5 ОД рестриктази PstI («Ферментас», Литва) в буфері О наступного складу: 50 мМ трис-ацетату (рН 7.5), 10 мМ хлориду магнію, 100 мМ ацетату хлориду натрію, 0.1 мг/мл альбуміну. За наявності в -47 положенні промотору аденіну PstI розщеплює ампліфіковану ділянку промотору (розмір 343 пар основ) на два фрагменти — 170 та 173 пар основ, які візуалізуються як одна смужка в агарозному гелі (рис. 1), при генотипі G/A візуалізується два фрагменти наступного розміру: 343 п.о. та сумарне свічення двох фрагментів (170 п.о. та 173 п.о.). При найбільш розповсюдженному генотипі рестрикція фрагменту не відбувається і візуалізується один ампліфікат розміром 343 пари основ.

Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5 % агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізація ДНК після горизонтального електрофорезу (160 V протягом 40 хв) проводилася за допомогою трансілюмінатора («Біоком», Росія) та відеосистеми ViTrap (Росія).

Статистичну обробку проводили у спеціалізованому статистичному пакеті SPSS версії 20.0. Відповідність розподілу генотипів згідно закону Харді-Вайнберга була перевірена за допомогою он-лайн калькулятора (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). З метою встановлення можливої асоціації між поліморфізмом промотору ( $G^{-47} \rightarrow A$ ) гену  $\gamma$ -кристаліну та ризиком розвитку катаракти був застосований метод  $\chi^2$ -критерію за Пірсоном. Статистично значимі результати вважали при  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Генотипування пацієнтів з катарактою та без її ознак показало, що розподіл генотипів у цих групах суттєво відрізняється, відхилені від закону розподілу не спостерігалось. Було встановлено наступний розподіл аельних варіантів: G/G — 35,37 % G/A — 53,66 % A/A — 10,98 % у хворих на катаракту та G/G — 55,06 % G/A — 35,96 % A/A — 8,99 % у контрольній групі (Рис. 2А). Проведений статистичний аналіз із застосуванням  $\chi^2$ -критерію Пірсона встановив вірогідність розподілу аельних варіантів ( $p=0,03$ ). Аналіз розподілу аелей (Рис. 2Б) також відрізняє групу хворих на катаракту — частота мінорного аелю становила 0,38 (в контрольній групі — 0,27,  $p=0,03$ ). При порівнянні отриманих даних розподілу генотипів гена  $\gamma$ -кристаліну ( $G^{-47} \rightarrow A$ ) в українській популяції із такими в інших популяціях можна прийти до висновку, що цей розподіл дещо відрізняється від такого у європейських популяціях [10].



**Рис. 2.** Розподіл генотипів (А) та алелей (Б) гену  $\gamma$ -кристаліну (поліморфізм промотору  $G^{-47} \rightarrow A$ ) у практично здорових людей без ознак вікової катаракти (білі стовпчики) та у хворих на катаракту (чорні стовпчики).

За даними dbSNP (NCBI), частота G/G генотипу коливається від 37,5 до 47,8 %, G/A від 39,0 до 54,2 % та генотипу A/A від 8,3 до 15,3 %. Українська популяція відрізняється значно більшою частотою G/G генотипу та меншою частотою G/A генотипу (G/G — 35,37 % G/A — 53,66 %). Не дивно, що розподіл генотипів цього гену в азійських та африканських популяціях суттєво відрізняється від частоти варіантів цього гену у європеїдів [10]. Так, частота G/G генотипу у азійців коливається від 51 до 87,8 %, G/A від 12,2 до 39,8 % та генотипу A/A від 0 до 11,4 %. У негроїдів частота генотипів промотору гену  $\gamma$ -кристаліну є наступною: G/G від 70 до 88,3 %, G/A від 11,7 до 26 % та A/A від 0 до 4,3 %. Таким чином, можна зробити висновок, що частота мінорного алелю є найменшою в популяції негроїдів, які, як відомо, зазнавали протягом еволюції впливу сонячного випромінювання найбільшої інтенсивності. Азіати, а ще більшою мірою європейці, могли «дозволити» собі зберігати в геномі А-алель, бо мешкали переважно у більш північних широтах. Добре відомо, що ультрафіолетове випромінювання

є одним з найбільш вагомих факторів ризику розвитку катаракти, і зміни експресії гену кристаліну за умов високого рівня інсоляції одразу могли позначитися на стані здоров'я людей, погіршуючи їх зір. На жаль, даних про розподіл генотипів у хворих на катаракту ми не знайшли, що не дає нам можливість порівняти їх частоту із такою в інших популяціях. З іншого боку, нам вперше в світі вдалося встановити, що частота розподілу генотипів та алелей у хворих на катаракту значно відрізняється від такого у практично здорових людей.

**Заключення.** Отримані результати вказують на те що, досліджений поліморфізм гену  $\gamma$ -кристаліну частіше зустрічається у хворих на катаракту та може розглядатися як генетичний фактор ризику цього захворювання. Досить молодий вік людей, що були відібрані для участі у дослідженні, свідчить про прискорений розвиток вікових змін у кришталику і, з огляду на це, вказаний генетичний маркер може бути застосований для первинного скринінгу людей з високим ризиком розвитку катаракти і з наступним проведенням профілактичних заходів.

### Висновки

1. Розподіл алельних варіантів промотору ( $G^{-47} \rightarrow A$ ) гену  $\gamma$ -кристаліну (rs2289917) суттєво відрізняється у хворих на катаракту та у контрольній групі.
2. Українська популяція відрізняється значно більшою частотою G/G генотипу та меншою частотою G/A генотипу у порівнянні з іншими європеїдами.
3. Поліморфізм в гені  $\gamma$ -кристаліну асоційований з розвитком катаракти в українській популяції.

### Література

1. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В. С. Баранова. — СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. — 528 с.
2. Abraham A. G., Condon N. G., West Gower E. The new epidemiology of cataract // Ophthalmol. Clin. North Am. — 2006. — Dec; 19 (4). — P.415–25.
3. Barreiro L. B., Laval G., Quach H., Patin E., Quintana-Murci L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans // Nat. Genet. — 2008. — Mar; 40 (3). — P.340–5.
4. Behndig A., Montan P., Stenevi U., Kugelberg M., Lundstrum M. One million cataract surgeries: Swedish National Cataract Register 1992–2009 // J. Cataract Refract. Surg. — 2011. — Vol.37. — № 8. — P.1539–1545.
5. Cardis E., Hatch M. The Chernobyl accident — an epidemiological perspective. // Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.). — 2011. — May; 23 (4). — P.251–60.
6. Coroneo M. Ultraviolet radiation and the anterior eye // Eye Contact Lens. — 2011. — Vol.37, № 4. — P.214–224.
7. Fletcher A. E. Free radicals, antioxidants and eye diseases: evidence from epidemiological studies on cataract and age — related macular degeneration // Ophthalmic Res. — 2010. — Vol. 44 (3). — P.191– 8.
8. Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond // Exp. Eye Res. — 2009. — Feb; 88 (2). — P.173–89.
9. Hiratsuka Y., Ono K., Murakami A. Alcohol use and cataract // Curr. Drug Abuse Rev. — 2009. — Sep; 2 (3). — P.226–9.
10. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2289917](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2289917)
11. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/ru/>
12. Kapur S., Mehra S., Gajjar D., Vasavada A., Kapoor M., Sharad S., Alapure B., Rajkumar S. Analysis of single nucleotide polymorphisms of CRYGA and CRYGB genes in control population of western Indian origin // Indian J. Ophthalmol. 2009. — May-Jun; 57 (3). — P.197–201.
13. Karlsson M. K., Vonschewelov T., Karlsson C., Custer M., Rosengen B. E. Prevention of falls in the elderly: a review // Scand. J. Public Health. — 2013. — Vol.41, № 5. — P.442–454.
14. Lin Q., Zhou N., Zhang N., Zhu B., Hu S., Zhou Z., Qi Y. Genetic variations and polymorphisms in the

ezrin gene are associated with age — related cataract // *Mol. Vis.* — 2013. — Jul 20; 19. — P.1572–9. Print 2013.

15. **Roberts J. E.** Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration // *Eye Contact Lens.* — 2011. — Jul; 37 (4). — P.246–9.
16. **Santhiya S. T., Manisastry S. M., Rawley D.** et al. Mutation analysis of congenital cataracts in Indian families: identification of SNPS and a new causative allele in CRYBB2 gene // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2004. — Oct; 45 (10). — P.3599–607.
17. **Su S., Yao Y., Zhu R., Liang C.** et al. The associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age — related cataract: Jiangsu

Eye Study // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2013. — Feb 1; 54 (2). — P.1201–7.

18. **VanderVeen D. K., Andrews C., Nihalani B. R., Engle E. C.** Crystalline cataract caused by a heterozygous missense mutation in  $\gamma$ D-crystallin (CRYGD) // *Mol. Vis.* — 2011. — Vol.17. — P.3333–8.
19. **Weisschuh N., Aisenbrey S., Wissinger B., Riess A.** Identification of a novel CRYBB2 missense mutation causing congenital autosomal dominant cataract // *Mol. Vis.* — 2012. — Vol.18. — P.174–80.
20. **Zuercher J., Neidhardt J., Magyar I.** et al. Alterations of the 5'untranslated region of SLC16A12 lead to age — related cataract // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2010. — Jul; 51 (7). — P.3354–61.

Поступила 02.07.2014

### References

1. **Baranov VS.** Genetic passport — a basis of individual and predictive medicine. SPb: Izd-vo N-L; 2009. 528 p.
2. **Abraham AG, Condon NG, West Gower E.** The new epidemiology of cataract. *Ophthalmol. Clin. North. Am.* 2006; Dec19(4):415–25.
3. **Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L.** Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat. Genet.* 2008; Mar 40(3):340–5.
4. **Behndig A, Montan P, Stenevi U, Kugelberg M, Lundstrum M.** One million cataract surgeries: Swedish National Cataract Register 1992–2009. *J. Cataract Refract. Surg.* 2011;37(8):1539–45.
5. **Cardis E, Hatch M.** The Chernobyl accident —an epidemiological perspective. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*. 2011; May 23(4):251–60.
6. **Coroneo M.** Ultraviolet radiation and the anterior eye. *Eye Contact Lens.* 2011; 37(4):214–24.
7. **Fletcher AE.** Free radicals, antioxidants and eye diseases: evidence from epidemiological studies on cataract and age — related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 2010;44(3):191–8.
8. **Graw J.** Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp. Eye Res.* 2009; Feb 88(2):173–89.
9. **Hiratsuka Y, Ono K, Murakami A.** Alcohol use and cataract. *Curr. Drug Abuse Rev.* 2009; Sep 2(3):226–9.
10. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2289917](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2289917)
11. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/ru/>
12. **Kapur S, Mehra S, Gajjar D, Vasavada A, Kapoor M, Sharad S, Alapure B, Rajkumar S.** Analysis of single nucleotide polymorphisms of CRYGA and CRYGB genes in control population of western Indian origin. *Indian J. Ophthalmol.* 2009; May-Jun 57(3):197–201.

13. **Karlsson MK, Vonschewelov T, Karlsson C, Custer M, Rosengen BE.** Prevention of falls in the elderly: a review. *Scand. J. Public Health.* 2013;41(5):442–54.
14. **Lin Q, Zhou N, Zhang N, Zhu B, Hu S, Zhou Z, Qi Y.** Genetic variations and polymorphisms in the ezrin gene are associated with age — related cataract. *Mol. Vis.* 2013; Jul 20;19:1572–9.
15. **Roberts JE.** Ultraviolet radiation as a risk factor for cataract and macular degeneration. *Eye Contact Lens.* 2011 Jul;37(4):246–9.
16. **Santhiya ST, Manisastry SM, Rawley D, Malathi R, Anishetty S, Gopinath PM, Vijayalakshmi P, Namperumalsamy P, Adamski J, Graw J.** Mutation analysis of congenital cataracts in Indian families: identification of SNPS and a new causative allele in CRYBB2 gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004 Oct;45(10):3599–607.
17. **Su S, Yao Y, Zhu R, Liang C, Jiang S, Hu N, Zhou J, Yang M, Xing Q, Guan H.** The associations between single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes, DNA damage, and age — related cataract: Jiangsu Eye Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013 Feb 1;54(2):1201–7.
18. **VanderVeen DK, Andrews C, Nihalani BR, Engle EC.** Crystalline cataract caused by a heterozygous missense mutation in  $\gamma$ D — crystallin (CRYGD). *Mol. Vis.* 2011;17:3333–8.
19. **Weisschuh N, Aisenbrey S, Wissinger B, Riess A.** Identification of a novel CRYBB2 missense mutation causing congenital autosomal dominant cataract. *Mol. Vis.* 2012;18:174–80.
20. **Zuercher J, Neidhardt J, Magyar I, Labs S, Moore AT, Tanner FC, Waseem N, Schorderet DF, Munier FL, Bhat-tacharya S, Berger W, Kloeckener — Gruissem B.** Alterations of the 5'untranslated region of SLC16A12 lead to age — related cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. Jul; 51 (7):3354–61.

Received 02.07.2014