
AG-ПОЛИМОРФИЗМ КАК ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР РИСКА РАЗВИТИЯ СОМАТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

И.Н. Медведев, И.В. Амелина

Курский институт социального образования (филиал) РГСУ
ул. К. Маркса, 51, Курск, Россия, 305029

Цель исследования — изучение закономерности фенотипического проявления транскрипционной активности ядрышкообразующих районов хромосом на уровне основных белков клеточных мембран эритроцитов в качестве цитогенетического маркера предрасположенности к артериальной гипертензии.

Сравнительный анализ больных артериальной гипертензией и предрасположенных к ней лиц показал достоверно меньшую активность 10AgЯОР по сравнению с остальной популяцией, обуславливающую у них менее активный, чем у остальных индивидов, синтез белков мембран эритроцитов, что вносит существенный вклад в формировании артериальной гипертензии. Это позволяет считать уровень 10AgЯОР у человека цитогенетическим маркером предрасположенности и последующего развития артериальной гипертензии.

Ключевые слова: соматометрия, Ag-полиморфизм, ядрышкообразующие районы хромосом, цитогенетический маркер.

Выявление предрасположенности организма человека к развитию болезней цивилизации и в первую очередь артериальной гипертензии (АГ) привлекает сейчас внимание не только цитогенетиков, но и клиницистов. Не вызывает сомнения, что развитие АГ связано с особенностями генотипа [2]. В последнее время возникает вопрос о правильности выбора критериев, по которым индивиды могли бы разделяться на группы, для изучения биологической устойчивости организма. Предпочтение может быть отдано таким признакам, которые связаны с возможно большим числом морфофункциональных систем организма и характеризуются достаточно высоким коэффициентом наследуемости. Одним из таких признаков может считаться транскрипционная активность ядрышкообразующих районов (ЯОР) у человека [4].

Установлено, что ЯОР у человека локализируются в коротких плечах (вторичных перетяжках) пяти пар акроцентрических хромосом (13—15 и 21—22 пары) [2; 5]. В ЯОР локализируются рибосомные гены (РГ), которые представлены у человека множественными копиями (от 350 до 600 на диплоидный набор хромосом) [9].

В результате разработки метода селективной окраски серебром ЯОР хромосом (Ag-окрашивание) впервые появилась возможность на цитологическом уровне изучать транскрипционную активность ЯОР 10 акроцентрических хромосом (10Ag-ЯОР) [9; 10]. Было предложено суммарный размер 10AgЯОР, выраженный в условных единицах (у.е.), рассматривать как критерий активности ЯОР [10]. Суммарная активность 10AgЯОР складывается из активных ЯОР D-хромосом (13—

15 пара — *D*-ЯОР) и *G*-хромосом (21—22 пара — *G*-ЯОР). Варианты AgЯОР каждой хромосомы наследуются в поколениях как независимые менделирующие признаки. Сумма размеров 10AgЯОР характеризует количество активных ЯОР в клетке и служит основой для сравнения индивидуальных геномов по этому признаку (Ag-полиморфизм).

Цель настоящего исследования — изучение закономерности фенотипического проявления транскрипционной активности ЯОР хромосом на уровне основных белков клеточных мембран эритроцитов в качестве цитогенетического маркера предрасположенности к развитию соматической патологии на примере артериальной гипертензии.

Материалы и методы исследования. Настоящее исследование выполнено на периферической крови добровольцев, которую забирали из локтевой вены. Выборка была случайной и состояла из 106 коренных жителей Курской области: Поныровского, Октябрьского и Курского районов (в том числе 36 больных АГ 1—3 степени, 38 лиц наследственно отягощенных по развитию АГ и 32 человека, не страдавших обменными и кардиальными заболеваниями, при отсутствии их у ближайших родственников). Культивирование крови и приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по стандартной методике [7]. Клетки фиксировали в фиксаторе Карнуа (метанол + уксусная кислота) в соотношении 3 : 1 в течение трех и более часов. Культивирование лимфоцитов крови и приготовление препаратов проводили строго стандартно во всех случаях. После приготовления препараты выдерживали при комнатной температуре для окраски нитратом серебра 14 дней. Для выявления транскрипционно активных ЯОР хромосом использовали метод, предложенный У. Хоуэлом [10]. Количество активных ЯОР определяли с помощью светового микроскопа «Биолам» (увеличение 10 × 90). Число окрашенных ЯОР подсчитывали в каждой анализируемой метафазной пластинке. Визуальная оценка этого показателя производилась по 5-балльной системе: 0 баллов — окраска отсутствует — данный ЯОР неактивен; 1 балл — слабая окраска (выпавшие зерна серебра, на спутничных нитях, уже ширины хроматиды); 2 балла — средняя окраска (зерна серебра соответствуют ширине хроматиды); 3 балла — интенсивная окраска (зерна серебра превышают по размерам ширину хроматиды); 4 балла — высоко интенсивная окраска (зерна серебра, выпавшие на каждой хроматиде значительно шире ее и слипаются вместе, образуя общий конгломерат) [5; 6].

Получение эритроцитов проводили из гепаринизированной крови, далее из полученной очищенной массы эритроцитов проводили выделение мембран с помощью одномерного электрофореза, проводящегося в пластинах с полиакриламидным гелем с последующим окрашиванием электрофореграмм красителем «Кумасси G-225» [7]. На электрофореграммах идентифицировали 16 белковых фракций. Денситометрирование электрофореграмм проводили на лазерном денситометре Ultrascan XL [7].

Статистическая обработка материала проведена на ПВМ IBM PC/AT (486) с использованием программы GEN 1 [7] и пакета прикладных программ.

Результаты исследований. Функциональное состояние ЯОР хромосом оценивалось среди всей выборки коренных жителей Курской области составила $19,46 \pm 0,13$ у.е. При этом величина *D*-ЯОР была $11,68 \pm 0,09$ у.е., а *G*-ЯОР — $7,78 \pm 0,07$ у.е. Самое низкое значение 10AgЯОР в общей выборке составило $15,63$ у.е., а самое высокое — $23,52$ у.е.; у *D*-ЯОР — $9,33$ и $14,75$ у.е., у *G*-ЯОР — $5,41$ и $10,62$ у.е. соответственно.

Жители, включенные в изучаемую выборку, были разбиты на три группы по суммарной активности ЯОР: с низким, средним и высоким количеством 10AgЯОР .

Группа жителей с низким количеством 10AgЯОР составила 33%; со средним количеством — 36%; с высоким количеством — 31%.

Полученные данные по Ag-полиморфизму не расходились с данными литературы [1; 2] и проведенными ранее в Курской области исследованиями, показавшими небольшое присутствие в популяции ЯОР с размерами 0 и 4 у.е.

С целью выяснения связи ЯОР с заболеваемостью АГ общая группа обследованных была поделена на больных АГ; лиц, предрасположенных к развитию АГ; на людей, не имевших обменных и кардиальных заболеваний и не предрасположенных к развитию АГ. При данном разделении общей выборки на группы установлено отсутствие достоверности различий оцениваемых цитогенетических показателей между двумя первыми группами, в которые вошли лица с низким и средним количеством 10AgЯОР при высоком количестве активных ЯОР в 3-ей группе лиц. Так, 1-я и 2-я группы имели транскрипционную активность в среднем: 10AgЯОР — $17,4 \pm 0,12$ у.е., *D*-ЯОР — $10,8 \pm 0,08$ у.е.; *G*-ЯОР — $7,6 \pm 0,07$ у.е.; в 3-й группе отмечена более высокая транскрипционная активность при следующих средних значениях: 10AgЯОР — $20,9 \pm 0,12$ у.е., *D*-ЯОР — $12,8 \pm 0,08$ у.е.; *G*-ЯОР — $8,1 \pm 0,09$ у.е.

Учитывая, что уровень белков мембран эритроцитов тесно связан с формированием предрасположенности и в последующем клиническим развитием АГ [8], этот признак в настоящем исследовании был избран в качестве фенотипического проявления транскрипционной активности ЯОР на молекулярном уровне. Считается, что основным механизмом реализации дефекта состава белков мембран эритроцитов (БМЭ) являются нарушения транспорта иона натрия через мембрану красных кровяных телец.

Установлено, что у здоровых индивидов количество БМЭ в целом было больше, чем у больных с АГ и предрасположенных к ней лиц.

Сравнительный анализ групп больных АГ и предрасположенных к ней лиц не показал между ними достоверных различий по содержанию белков мембран эритроцитов.

Оценка белкового состава мембран эритроцитов у больных АГ и предрасположенных к ней показала более низкое содержание в их мембранах некоторых протеинов: β -спектрина — $137,61 \pm 1,9$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, 2,2-анкирина $13,24 \pm 0,84$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, белка БП 3 $224,66 \pm 3,6$

мкг/1 мг общего белка исключая Нв, белка 4,9 $28,44 \pm 1,2$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, белка 6 $19,58 \pm 1,36$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, белка 7 $84,31 \pm 3,78$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв по сравнению с лицами, не имеющими АГ и не предрасположенных к ней ($149,4 \pm 3,36$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, $16,23 \pm 1,1$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, $231,99 \pm 2,85$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, $31,5 \pm 1,52$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, $26,1 \pm 1,33$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв, $91,98 \pm 4,02$ мкг/1 мг общего белка исключая Нв соответственно).

В результате сравнения групп больных АГ и предрасположенных к ней лиц со здоровыми людьми по белкам мембран эритроцитов бы выявлен следующий уровень достоверности различий: β -спектрин ($t = 2,09$), 2,2-анкирин ($t = 6,04$), белок БП 3 ($t = 2,17$), белок 4,9 ($t = 2,01$), белок 6 ($t = 2,79$) и белок 7 ($t = 2,64$).

Таким образом, достоверные различия уровней Ag-полиморфизма и транскрипционной активности ЯОР, выражающегося в количественных показателях белков мембран эритроцитов у больных АГ и предрасположенных к ней, с одной стороны, и у лиц, не имеющих АГ и наследственной к ней предрасположенности — с другой, позволяет считать уровень 10AgЯОР цитогенетическим маркером предрасположенности к развитию АГ.

Обсуждение результатов. В результате исследования получены достоверные популяционные различия Ag-полиморфизма между здоровыми, с одной стороны, и больными АГ и предрасположенными к ней, с другой стороны, при отсутствии различий между последними.

Ag-полиморфизм среди коренных жителей Курской области в среднем составил 19,46 у.е. При этом группа с низким и средним количеством 10AgЯОР соответствовала лицам с АГ и предрасположенным к ней, а лица с высоким 10AgЯОР соответствовали людям, не имевшим обменных и кардиальных заболеваний и наследственной к ним предрасположенности. Особенности Ag-полиморфизма у жителей Курской области в условиях изоляции расстоянием заключаются в малом количестве ядрышкообразующих районов размерами с 0 у.е. и 4 у.е. Незначительное присутствие ЯОР с 0 у.е. можно объяснить изоляцией, при которой происходит разделение популяции на доминантные и рецессивные аллели. Так как существует некоторое пороговое значение 10AgЯОР (ниже которого происходит элиминация зиготы на ранних этапах дробления), выживают особи, содержащие доминантные аллели, что ведет к достаточному присутствию количества активных ЯОР у индивидов при незначительном присутствии хромосом, у которых отсутствуют серебриющиеся районы. Накопление же ЯОР с крупными Ag-блоками (4 у.е.), по данным разных авторов, может происходить при крайне неблагоприятных условиях [1—2], тогда как в Курской области таких условий не наблюдается.

В литературе встречаются лишь отдельные работы по фенотипическому эффекту активности ЯОР у человека. Ранее установлено существование статистически значимых положительных корреляций 10AgЯОР с соматометрическими показателями и уровнем артериального давления крови [2; 3]. В то же время в ли-

тературе недостаточно данных о проявлении функционального Ag-полиморфизма при различных заболеваниях человека, в том числе АГ.

Сравнительный анализ больных АГ и предрасположенных к ней обследуемых показал достоверно меньшую активность 10AgЯОР по сравнению с остальной популяцией, обуславливающую у них менее активный, чем у остальных индивидов, синтез белков мембран эритроцитов, что способствует увеличению их жесткости, играя существенную роль в формировании АГ. Присутствие связи между функциональной активностью ЯОР и развитием артериальной гипертензии позволяет считать уровень 10AgЯОР (17,4 у.е. и ниже) цитогенетическим маркером риска развития АГ.

Таким образом, установленные различия Ag-полиморфизма и проявляющиеся в этой связи различия содержания белков мембран эритроцитов, играющих роль в развитии АГ, являются надежным критерием предрасположенности и последующего развития АГ.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Викторов В.В., Егорова Н.А., Ляпунова Н.А. Сравнение Ag-вариантов ядрышкообразующих хромосом человека в популяциях Москвы и Забайкалья // Второй всесоюзный съезд медицинских генетиков: Тезисы докладов. — М., 1990. — С. 77—78.
- [2] Воскобойник Н.И., Ляпунова Н.А., Викторов В.В. Взаимосвязь функциональной активности ядрышкообразующих районов хромосом с репродуктивной патологией человека // Генетика. — 1993. — № 3. — С. 508—513.
- [3] Кравец И.А. Цитогенетические подходы к изучению межхромосомного полиморфизма ядрышкообразующих районов хромосом человека: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М., 1994.
- [4] Ляпунова Н.А. Полиморфизм ядрышкообразующих районов хромосом человека: структурные и функциональные аспекты // Второй всесоюзный съезд медицинских генетиков: Тезисы докладов. — М., 1990. — С. 537—538.
- [5] Ляпунова Н.А., Кравец-Мандрон И.А., Цветкова Т.Г. Цитогенетика ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом человека: выделение четырех морфофункциональных вариантов ЯОР, их межиндивидуальное и межхромосомное распределение // Генетика. — 1998. — № 9. — С. 1298—1306.
- [6] Ляпунова Н.А. и др. Ядрышкообразующие районы хромосом человека: опыт количественного цитологического и молекулярного анализа // Биологические мембраны. — 2001. — Т. 18 — № 3. — С. 189—199.
- [7] Залетаева Т.А., Кулешов Н.П., Залетаев Д.В., Барцева О.Б. Современные методы хромосомного анализа в клинико-цитогенетических исследованиях. — М.: Медицина, 1994.
- [8] Шилов А.М., Авшалумов А.С., Синицина Е.Н. Изменения некоторых свойств у больных с метаболическим синдромом // Российский медицинский журнал. — 2008. — Т. 16. — № 4. — С. 200—204.
- [9] Hofgartner F.I., Schmid M., Krone M. Pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver — staining // Chromosoma. — 1979. — Vol. 71. — № 2. — P. 197—216.
- [10] Howell W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes // Chromosome. — 1977. — Vol. 62. — № 4.

AG-POLYMORPHISM AS CYTOGENETIC A MARKER OF RISK OF DEVELOPMENT SOMATIC OF A PATHOLOGY

I.N. Medvedev, I.V. Amelina

Kursk Institute of social education
(branch of the institute RSSU (Russian State Social University))
K. Marks str., 53, Kursk, Russia, 305029

The aim of the investigation is the study of the regularity of the phenotypic manifestation of the transcriptional activity of the nucleus-forming chromosome regions on the level of the basic proteins of erythrocyte cell membranes as a cytogenetic marker of some predisposition to the arterial hypertonia.

The comparative analysis of patients with arterial hypertonia and those predisposed to it demonstrated for certain a less 10AgЯОР activity in comparison with the remaining population, conditioning a less active erythrocyte membrane protein synthesis in them, than that in the remaining individuals, which contributes considerably to the arterial hypertonia development. This allows us to regard the 10AgЯОР level as a cytogenetic marker of predisposition and further development of the arterial hypertonia in a human being.

Key words: somatometric indices, Ag-polymorphism, nucleus organizing regions, cytogenetic marker.