

AG-ПОЛИМОРФИЗМ КАК ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР РИСКА РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

Медведев И.Н.^{*}, Амелина И.В.

Курский институт социального образования (филиал) РГСУ, Курск

Резюме

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 индивидуумов 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: артериальная гипертензия, риск развития, цитогенетический маркер.

Изучение 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].

Известно, 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), представленные у человека множественными копиями (от 350 до 600 на диплоидный набор хромосом) [9].

С разработкой 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 артериальной гипертензии.

Материалы и методы

Материалом настоящего исследования послужила периферическая кровь 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 наследственноотягощенных по развитию АГ и 32 человека, не страдающих 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 ядрышкообразующих районов хромосом использовали метод, предложенный Howell W.M. [9]. 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 — сла-

бая 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].

Эритроциты получали из гепаринизированной крови, далее из полученной очищенной массы эритроцитов проводили выделение мембран с помощью одномерного электрофореза, проводящегося в пластинках 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

Оценка функционального состояния ЯОР хромосом среди всей выборки коренных жителей Курской области составила $19,46 \pm 0.13$ у.е. При этом величина D-ЯОР была 11.68 ± 0.09 у.е., а G-ЯОР — 7.78 ± 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.

Исследуемая выборка была разбита на три группы индивидуумов по суммарной активности ЯОР: с низким, средним и высоким количеством 10AgЯОР.

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

Все 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.

Для выяснения связи ЯОР с заболеваемостью АГ общая группа обследованных была поделена на больных АГ, лиц, предрасположенных к развитию АГ, и на лиц, не имевших обменных и кардиальных заболеваний и не предрасположенных к их развитию. 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 10 AgЯОР при высоком количестве активных ЯОР в третьей группе лиц. Так, 1 и 2 группы имели транскрипционную активность в среднем: 10AgЯОР — 17.4 ± 0.12 у.е., D-ЯОР

— 10.8 ± 0.08 у.е.; G-ЯОР — 7.6 ± 0.07 у.е.; в третьей группе отмечена более высокая транскрипционная активность при следующих средних значениях: 10AgЯОР — 20.9 ± 0.12 у.е., D-ЯОР — 12.8 ± 0.08 у.е.; G-ЯОР — 8.1 ± 0.09 у.е.

Учитывая, что уровень белков мембран эритроцитов тесно связан с формированием предрасположенности и последующим 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 являются нарушения транспорта иона натрия через мембрану красных кровяных телец.

Установлено, что у здоровых индивидуумов 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 достоверных различий между ними по содержанию белков мембран эритроцитов.

Анализ белкового состава мембран эритроцитов у больных АГ и предрасположенных к ней лиц показал более низкое содержание в их мембранах некоторых протеинов: β -спектрина — $137,61 \pm 1,9$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв; 2,2-анкирина $13,24 \pm 0,84$ мкг/1мг общего белка исключая Нв, белка БП — $3\ 224,66 \pm 3,6$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, белка 4,9 $28,44 \pm 1,2$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, белка 6 $19,58 \pm 1,36$ мкг/1 мг общего белка, исключая Нв, белка $784,31 \pm 3,78$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, по сравнению с лицами, не имевшими АГ и не предрасположенных к ней ($149,4 \pm 3,36$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, $16,23 \pm 1,1$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, $231,99 \pm 2,85$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, $31,5 \pm 1,52$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, $26,1 \pm 1,33$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, $91,98 \pm 4,02$ мкг/1мг общего белка, исключая Нв, соответственно).

При сравнении групп больных АГ и предрасположенных к ней лиц со здоровыми лицами по белкам мембран эритроцитов был 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 лиц, 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

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

Функциональный 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 лицам, не имевших 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 и 4 у.е. Незначительное присутствие ЯОР с 0 у.е. можно объяснить действием изоляции расстоянием, при котором происходит разделение популяции на доминантные и рецессивные аллели. Так как существует некоторое пороговое значение 10AgЯОР (ниже которого происходит элиминация зиготы на ранних этапах дробления), то выживают особи, содержащие доминантные аллели, что ведет к достаточному присутствию количества активных ЯОР у индивидов при незначительном присутствии хромосом, у которых отсутствуют серебристые 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 Курская область к таким районам не относится.

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 литературе 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, внося существенный вклад в формирование 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., Н.А. Еголина, Н.А. Ляпунова. Сравнение Ag-вариантов ядрышкообразующих хромосом человека в популяциях Москвы и Забайкалья / Второй всесоюзный съезд медицинских генетиков: тезисы докладов. — Москва. — 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. на соискание ученой степени к.б.н. — М., 1994. — 19с.
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., И.А. Кравец — Мандрон, Т.Г. Цветкова. 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. Т.А. Залетаева, Н.П. Кулешов, Д.В. Залетаев, О.Б. Барцева. Современные методы хромосомного анализа в клинико-цитогенетических исследованиях. РМАПО — М.: Медицина, 1994. — 68 с.
8. Шилов А.М., А.С. Авшалумов, Е.Н. Синицина. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом // Российский медицинский журнал.-2008.- Т.16-№ 4.-С.200–204.
9. Hofgartner F.I., Schmidt M., Krone M. Pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver — staining // Chromosome. — 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.

Abstract

The aim of the study was to investigate the phenotypic manifestations of chromosome nucleoli area transcription activity, at the level of erythrocyte cell membrane main proteins, as a cytogenetic marker of arterial hypertension (AH) risk. The comparison of AH patients and people at AH risk demonstrated significantly reduced activity of nucleoli area 10Ag activity, comparing to the main population. In the former, this could explain less active erythrocyte membrane protein synthesis, linked to AH development. Therefore, human nucleoli area 10Ag levels could be regarded as a cytogenetic marker of AH risk and development.

Key words: Arterial hypertension, development risk, cytogenetic marker.

Поступила 14/12-2008

© Коллектив авторов, 2009

305035, г. Курск, ул. Пирогова, дом 126

[Медведев И.Н. (*контактное лицо) — профессор, зав. кафедрой адаптивной физкультуры и спорта, Амелина И.В. — сотрудник кафедры].