

На правах рукописи

**КОХТЕНКО ЕЛЕНА ВАСИЛЬЕВНА**

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ,  
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ИХ ТРАНСКРИПЦИИ И ГЕНОВ  
ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У  
БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена на базах научно-исследовательской лаборатории «Генетика» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Курский государственный университет» и лаборатории медицинской генетики кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Трубникова Елена Владимировна**

Кандидат биологических наук, доцент, заведующая Научно-исследовательской лабораторией «Генетика» ФГБОУ ВПО «Курский государственный университет»

**Официальные оппоненты:**

**Спицын Виктор Алексеевич**

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экологической генетики ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН

**Федорин Дмитрий Николаевич**

Доцент кафедры биохимии и физиологии клетки ФГОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 17 апреля в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.05 в ФГБОУ ВПО Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, дом 8.

С диссертацией можно ознакомиться в УНИЦБ РУДН по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, дом 6.

Автореферат разослан «      »      2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент

О.Б. Гигани

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

По данным Всемирной Организации Здравоохранения глаукома стоит на втором месте среди заболеваний, приводящих к слепоте [Goldberg I., 2000; Rochtchina E. et al., 2000].

Наибольшее значение среди различных клинических форм глауком имеет первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ). Она составляет от 70,0% до 92,0% случаев заболевания глаукомой [Gong G. et al., 2004; Ishikawa K. et al., 2004]. На сегодняшний день ПОУГ поражено примерно около 40 млн. человек в мире и эта цифра с течением времени неуклонно увеличивается [Либман Е.С., 2000].

В развитых странах первичная открытоугольная глаукома является главной причиной слабости зрения и слепоты среди лиц трудоспособного возраста [Quigley H.A., 2006; Нестеров А.П., 2008]. С возрастом процент заболеваемости ПОУГ увеличивается. Если в 40–45 лет первичной открытоугольной глаукомой болеет 0,1% населения, то в 50–60 лет уже 1,5-2%, а в 75 лет и старше – около 10% [Сидоренко Е.И., 2002; Сомов Е.Е., 2005]. В настоящее время установлено, что ПОУГ является мультифакториальным заболеванием, особенностью которого является апоптоз, заключающийся в запрограммированной гибели клеток и их белковой перестройке. Как известно основными функциями белков в организме являются: строительная, защитная, транспортная, ферментативная, при этом течение глаукоматозного процесса, очевидно, отражает состояние белок синтезирующего аппарата и находится в определенной зависимости от его биологической устойчивости [Куроедов А. В., 2003; Еричев В. П., Ловпаче Д. Н., 2004].

Как известно синтез всех белков идет на рибосомах, основой которых является рРНК, поэтому возникновение изменений в рРНК ведет к нарушению синтеза белков, и как следствие, нарушению нормального течения процессов во всем организме и возникновению различных патологий, в том числе и первичной открытоугольной глаукомы [Lawrence R.J, et al, 2004; Murray H.D., 2003; Ярыгин В.Н., 2003].

Однако, в противоположность распространенному мнению об экзогенной природе глауком, исследования последних лет показали существование большого числа моногенных вариантов, для которых идентифицированы гены и определен ряд мажорных мутаций [Founti, P., Torouzis, F, 2009].

Некоторыми исследователями показано, что мутации в гене *CYP1B1* являются основной причиной развития первичной врожденной, первичной ювенильной глаукомы и первичной открытоугольной глаукомы взрослых [Doshi M., 2006; Messina-Baas O.M., 2006]. Известно, что продукт этого гена является одним из важных факторов детоксикации ксенобиотиков, часть из которых обладает тератогенным эффектом. Таким образом, нарушение функции этого белка может приводить к снижению «защитных» функций организма к воздействию тератогенных факторов, и обуславливать формирование пороков угла передней камеры глаза [Kaig K., Mukhopadhyay A., 2005]. Установлено, что при катаракте наблюдается ассоциация делеционного варианта частоты гена *GSTM* с тяжестью заболевания. В то же время наблюдается выше частота делеционного варианта гена *GSTT* при катаракте в сравнении с контролем [Mishra D.K., 2004; Ng D.P., Tan K.W., 2005].

В литературе, крайне недостаточно освещены вопросы, касающиеся исследования влияния полиморфизмов генов ферментов биотрансформации

ксенобиотиков на развитие ПОУГ, а исследования, касающиеся изучения регуляции синтеза рРНК при первичной открытоугольной глаукоме, до настоящего времени остаются единичными. Мало изученным остается вопрос о фенотипическом проявлении дозы рибосомных генов у человека и оценки их вклада в генетическую индивидуальность.

Таким образом, проблемы фенотипического проявления активности рибосомных генов на молекулярном уровне и степень вовлеченности генов ФБК в развитии глаукомы являются актуальными, что и определяет проведение настоящего исследования.

### **Цель исследования**

Изучить особенности влияния полиморфизмов генов факторов транскрипции рибосомных генов и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков на показатели функциональной активности рибосомальных генов у больных первичной открытоугольной глаукомой.

### **Задачи исследования**

1. Изучить уровень функциональной активности рибосомных генов у здоровых и у больных первичной открытоугольной глаукомой жителей Курской области.

2. Определить частоты аллелей и генотипов генов, регулирующих транскрипцию рибосомальных генов и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у здоровых и у больных первичной открытоугольной глаукомой жителей Курской области.

3. Провести анализ ассоциаций аллелей и генотипов 4 полиморфизмов генов, регулирующих транскрипцию рибосомальных генов, TP53 (R72P), DNMT3B (C149T), POLR1B (S295L), TAF1B (A6S) с предрасположенностью к первичной открытоугольной глаукоме.

4. Провести анализ ассоциаций аллелей и генотипов 5 полиморфных вариантов 5 генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков: CYP1A1 (I462V), EPHX (H139R), GSTP1 (I105V), GSTM1 (del/+), GSTT1 (del/+) с предрасположенностью к первичной открытоугольной глаукоме.

5. Установить характер и степень взаимосвязи полиморфизмов этих генов и уровня функциональной активности рибосомных генов.

### **Научная новизна работы**

Впервые проведена оценка состояния функциональной активности рибосомных генов у людей больных первичной открытоугольной глаукомой. В работе впервые подробно исследованы полиморфизмы генов, регулирующих транскрипцию рибосомных генов, их распределение среди здоровых и больных первичной открытоугольной глаукомой жителей Курской области; установлены характер и степень взаимосвязи полиморфизмов генов, регулирующих транскрипцию рибосомных генов и генов ФБК, с функциональной активностью рибосомных генов, как среди здоровых, так и среди больных жителей Курской области; впервые определено влияние полиморфизмов рассматриваемых генов на развитие глаукоматозного процесса у человека, что открывает перспективы для прогнозирования развития и исхода заболевания.

## **Практическая значимость работы**

Работа относится к категории фундаментальных исследований. Ее результаты работы имеют огромную практическую и теоретическую значимость. Они представляют собой базовые знания по изучению проблемы регуляции уровня экспрессии белоксинтезирующего аппарата при первичной открытоугольной глаукоме.

Представляется полезным введение оценки функциональной активности рибосомных генов в практику работ научно-исследовательской лаборатории «Генетика» КГУ и лаборатории медицинской генетики КГМУ при изучении мультифакториальной патологии.

Полученные результаты могут быть использованы в клеточной биологии, молекулярной, клеточной и популяционной генетике, биохимии и других научных дисциплинах, также в учебных процессах кафедр биологии, медицинской генетики и экологии, офтальмологии в высших учебных заведениях соответствующей направленности.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Установлен уровень функциональной активности рибосомных генов у больных первичной открытоугольной глаукомой и здоровых жителей Курской области.

2. У больных первичной открытоугольной глаукомой выявлено снижение одних показателей ФАРГ и повышение других показателей по сравнению со здоровыми индивидами.

3. Определены частоты аллелей и генотипов полиморфизмов генов TP53, DNMT3B, POLR1B, TAF1B, CYP1A1, EPHX, GSTP1, GSTM1, GSTT1 у больных первичной открытоугольной глаукомой и здоровых жителей Курской области.

4. Установлено, что делеционный полиморфизм гена глутатион-S-трансферазы (del/del GSTT1) ассоциирован с пониженным риском развития первичной открытоугольной глаукомы.

5. Выявлена связь полиморфизмов факторов транскрипции рибосомных генов и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с показателями функциональной активности рибосомных генов как у больных первичной открытоугольной глаукомой, так и у здоровых жителей Курской области.

6. Доказано, что сочетания генотипов генов ФБК и генов факторов транскрипции РГ оказывают влияние на показатели ФАРГ как у больных первичной открытоугольной глаукомой, так и в общей популяции.

## **Внедрение в практику**

Результаты исследования внедрены в работу Курской областной больницы, лаборатории медицинской генетики кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета, научно-исследовательской лаборатории «Генетика» Курского государственного университета.

## **Апробация и публикации**

Результаты работы представлены на 73-й и 74-й итоговых научных конференциях КГМУ и сессиях Центрально-Черноземного научного центра РАМН (Курск, 2008, 2009), международной научно-практической конференции: Теоритические и прикладные проблемы социально-правовых, медико-биологических

и технико-экономических сфер жизни общества (Курск, 2008), IV международной научной конференции «Vedaatechnologie: krokdobudoucnosti» (Praha-2008), на 73-й итоговой межвузовской конференции студентов и молодых ученых: Молодежная наука и современность: от фундаментальной идеи до инновационных проектов (Курск 2008, 2012), IV Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых. (Гомель, 2012). По материалам исследования опубликовано 22 работы, из которых 6 в журналах, рецензированных ВАК.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, библиографического списка. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы и 19 рисунков. Библиографический список используемой литературы включает 197 источников, из которых 125 зарубежные.

### **Личный вклад автора**

Диссертационная работа представляет собой законченный, самостоятельно выполненный автором труд. Все представленные в диссертации результаты получены лично Кохтенко Е.В. на базе научно-исследовательской лаборатории «Генетика» ФГБОУ ВПО «Курский государственный университет» (цитогенетическая часть) и лаборатории медицинской генетики кафедры биологии, медицинской генетики и экологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (молекулярно-генетическая часть). Ею проведена комплексная статистическая обработка и анализ сформированной базы данных, проанализированы отечественные и зарубежные источники по теме диссертации, получены и обобщены результаты исследования. В работах, выполненных в соавторстве, использованы результаты исследований с долей личного участия автора от 75 до 85%.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы исследования.**

Материалом для исследования послужила выборка коренных жителей Курской области, постоянно проживающих на ее территории. Группа «случай» включала 225 больных глаукомой в возрасте от 41 до 84 лет, средний возраст составил  $64,64 \pm 7,70$  года. Контрольная группа насчитывала 219 относительно здоровых людей, не имеющих в анамнезе заболевания «глаукома», в возрасте от 40 до 85 лет. Различий между группой контроля и группой случая ни по возрасту, ни по полу не наблюдалось ( $p < 0,05$ ). Данные по возрастному и половому составу в исследуемых группах представлены в таблице 1.

Таблица 1

*Возрастной и половой состав исследуемых групп*

Пол	Больные глаукомой (n=225)		Контроль (n=219)	
	Возраст (41-84 лет)	n(%)	Возраст (40-85 лет)	n(%)
мужчины	64,64±7,70	132 (58,7)	63,50 ±9,20	123 (56,2)
женщины		93 (41,3)		96 (43,8)

### Методы исследования

Цитогенетические методы. Получение цитогенетических препаратов проводили с помощью микрометода из лимфоцитов периферической крови человека [Захаров А.Ф., 1982.]. Культуральную смесь фиксировали на 72 часу после стимуляции ФГА по стандартным методикам [Назаренко С.А., 2003].

Полученную взвесь раскапывали на охлажденные стекла, высушивали, маркировали и хранили при комнатной температуре [А.Ф. Захаров, 1982.].

Для анализа функциональной активности рибосомных генов использовался метод дифференциальной окраски хромосом нитратом серебра в коллоидном проявителе (закисленный желатин), предложенный Howell и Black с некоторыми модификациями [Сабанаева Е.В., 1989; Howell W.M., 1975; Howell W.M., 1977]. Для каждого случая средний показатель суммарной активности 10 ЯОР рассчитывался без кариотипирования хромосом в 20 клетках. Количество активных РГ лимфоцитов периферической крови оценивалось визуально по пятибалльной шкале. Для анализа отбирались метафазные пластинки с завершенной Ag-окраской [Захаров А.Ф., 1982].

Всего проанализировано 8760 метафазных пластинок (4500 – в выборке больных и 4260 – в контрольной группе).

Молекулярно-генетические методы. Выделение ДНК производили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из замороженной венозной крови (Маниатис, Фрич, 1984). Осажденные в PBS (pH=8.4) лейкоциты лизировали в ТЕ-буфере протеиназой К в течении 20 часов при 37°C. ДНК лизированных лейкоцитов отмывали в несколько этапов. Сначала 1:1 фенолом, забуференным HCl (pH=7.4), потом забуференным фенолом и хлороформом (по одному объему фенола и хлороформа на два объема надосадочной жидкости) и после этого хлороформом (1:1). Затем ДНК преципитировалась этанолом (-20°C), высушивалась, растворялась ТЕ-буфером и замораживали (-20°C). Для лабораторных исследований использовали реактивы импортного производства высокой степени очистки.

Генотипирование полиморфизмов генов проводили методами ПЦР-ПДРФ и мультиплексной ПЦР (GSTM1 del/+ и GSTT1 del/+) согласно протоколам, описанным в литературе [Hong Y.C, 2000; Hassett C., 1994; Welfare M., 1999; Abdel-Rahman S., 1999].

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили в 12 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 мкл образца геномной ДНК. Смесь для амплификации включала: 67 мМ Трис-HCl pH=8.8, 16,6 мМ сульфата аммония, 6,7 мкМ ЭДТА, 2,0-7,0 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ β-меркаптоэтанола, 1 мМ каждого dNTPs, 15 нМ каждого из праймеров и полимеразы. Для предотвращения испарения амплификационной смеси и

образования конденсата на реакционную смесь наслаивали 30 мкл минерального масла. Амплификацию проводили на многоканальном термоциклере "Терцик" (НПО "ДНК-Технология", Москва). Последовательности праймеров и условия ПЦР для каждого исследуемого ДНК-полиморфизма были индивидуальны.

Рестрикцию амплифицированных фрагментов (5-10 мкл амплификата) производили с помощью эндонуклеаз. Продукты рестрикции фракционировались с помощью электрофореза в агарозных гелях различной концентрации и окрашивались в этидиумбромиде. Образовавшиеся в результате фракции визуализировались в проходящем УФ-свете на приборе GDS-8000 ("UVP", США) и программного аналитического пакета LabWorks™ V 4.5 (США).

В рамках настоящего исследования было прогенотипировано 4 полиморфных варианта 4 генов факторов транскрипции рибосомных генов, такие как: TP53 (R72P), DNMT3B (C149T), POLR1B (S295L), TAF1B (A6S) и 5 полиморфных варианта 5 генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков: CYP1A1 (I462V), EPHX (H139R), GSTP1 (I105V), GSTM1 del/+ и GSTT1 del/+.

Статистические методы. Статистический анализ полученных данных проводили на ПК с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 фирмы StatSoft Inc. (США) и MS Excel.

Обработку цитогенетических данных осуществляли по стандартным методикам вариационной статистики [Лакин Г.Ф., 1990, Реброва О.Ю., 2006, Урбах В.Ю., 1975].

Прежде всего, был проведен анализ характера распределения признаков в рассматриваемой выборке с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и по Шапиро-Уилку. Отклонения считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Так как распределение количественных признаков в большинстве случаев отклонялось от нормального, то при их описании использовали методы непараметрической статистики: медианы, верхнего и нижнего квартиля, а также расчет среднего значения, среднеквадратичного отклонения, 95% доверительного интервала для среднего значения, минимального и максимального значений признака [Реброва О.Ю., 2006]. При обработке качественных показателей вычисляли: размер выборочной доли в процентах и ошибку выборочной доли. Для проверки достоверности различий между совокупностями использовался непараметрический критерий Манна-Уитни [Реброва О.Ю., 2006]. Для выявления связей между количественными, а также порядковыми качественными признаками использовался корреляционный анализ по методу Спирмана.

Для оценки соответствия распределений генотипов факторов транскрипции рибосомных генов и ФБК ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга (РХВ) и для сравнения частот аллелей и генотипов в выборках больных глаукомой и здоровых людей использовали критерий Хи-квадрат Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность.

Для сравнения частот аллелей и генотипов между группами больных глаукомой и здоровых людей также использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса на непрерывность [Пузырев, Фрейдин и др., 2009]. По величине отношения шансов (OR) судили об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к глаукоме [Pearce N., 1993; Реброва О.Ю., 2003]. Он показывает во сколько раз вероятность оказаться в группе «случай» (больные) отличается от вероятности оказаться в группе «контроль» (здоровые) для носителя изучаемого генотипа. Границы 95%-го



доверительного интервала (CI) для OR вычисляли по методу В. Woolf [Лакин Г.Ф., 1990]. Связь между цитогенетическими показателями и молекулярно-генетическими маркерами изучали с помощью однофакторного дисперсионного анализа [Лакин Г.Ф., 1990]. Для анализа влияния парных сочетаний генотипов на показатели ФАРГ был использован двухфакторный дисперсионный анализ с расчетом объяснённой фенотипической дисперсии [Реброва О.Ю., 2006].

Во всех случаях уровень статистической значимости принимали за 95% ( $p < 0,05$ )

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИСЛЕДОВАНИЙ**

### **1. Уровень функциональной активности рибосомных генов у здоровых и у больных первичной открытоугольной глаукомой жителей Курской области.**

Одной из основных задач настоящего исследования было изучение показателей уровня функциональной активности рибосомных генов (ФАРГ) в популяционной группе жителей Курской области и выборке больных глаукомой. В первую очередь была проведена проверка на нормальность распределения признаков, согласно которой с использованием более «жесткого» критерия Шапиро-Уилка распределение соответствовало нормальному только по D-хромосомам в группе «контроль» и по 10 хромосомам и числу ассоциаций акроцентрических хромосом в выборке больных ПОУГ. В связи с тем, что критерий Шапиро-Уилка является наиболее «строгим» статистическим показателем, то для описания количественных признаков в дальнейшем мы использовали методы непараметрической статистики для всех анализируемых признаков.

Контрольная группа включала в себя 219 здоровых индивидов, жителей Курской области. Из них мужчины – 123 человека, что составило 56,2% и женщины – 96 человек, что составило 43,8% от общего количества. Средний возраст индивидов в контрольной группе составил  $63,50 \pm 9,20$  лет (95% CI 62,27-64,72) и варьировал от 40 лет до 85 лет. Значение медианы для возраста не отклонялось от среднего значения по выборке ( $Me=63,00$  года).

Выборка больных первичной открытоугольной глаукомой включала в себя 225 человек, из них мужчин было 132 человека (58,7%), женщин 93 человека (41,3%). Средний возраст в группе составил  $64,64 \pm 7,70$  года (95% CI 63,62-65,65 лет). Возраст варьировал от 41 года до 84 лет. Значение медианы по данному показателю практически не отличалось от среднего значения по группе ( $Me=66,00$  лет).

В ходе проведенного исследования впервые был определен уровень ФАРГ для больных с ПОУГ. Среднее значение ФАРГ в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой по 10 хромосомам составило  $19,24 \pm 1,77$  у.е. (95% CI 19,01-19,47 у.е.), значение медианы по 10 хромосомам не отклонялось от среднего значения по выборке ( $Me=19,15$  у.е.). Среднее значение показателей ФАРГ по D хромосомам составило  $11,54 \pm 1,16$  у.е. (95% CI 11,39-11,69 у.е.), а по G хромосомам  $7,69 \pm 1,38$  у.е. (95% CI 7,51-7,87 у.е.). Значения медиан также не отклонялись от среднего значения ( $Me=11,47$  у.е.;  $Me=7,85$  у.е.). Среднее количество активных рибосомных цистронов было равным  $7,37 \pm 0,72$  у.е. (95% CI 7,27-7,56 у.е.), значение медианы по показателю количества рибосомных цистронов не отклонялось от среднего значения ( $Me=7,40$  у.е.). Среднее число ассоциаций акроцентрических хромосом составило  $0,81 \pm 0,32$  у.е. (95% CI 0,77-0,86 у.е.), значение медианы не

отклонялось от среднего значения ( $Me=0,63$  у.е.). Среднее число акроцентрических хромосом, вступивших в ассоциации, было равно  $2,74\pm 0,54$  у.е. (95% CI 2,57-2,91 у.е.), значение медианы не отклонялось от среднего значения ( $Me=2,69$  у.е.). Среднее значение ассоциативного индекса было равно  $64,88\pm 16,60$  у.е. (95% CI 59,64-70,11 у.е.), так же значение медианы не отклонялось от среднего значения ( $Me=70,00$  у.е.).

В контрольной группе средний уровень показателей ФАРГ по 10 хромосомам составил  $19,23\pm 2,11$  у.е. (95% CI 18,95-19,52 у.е.), значение медианы по 10 хромосомам не отклонялось от среднего значения по выборке ( $Me=19,13$  у.е.). Среднее значение показателей ФАРГ по D хромосомам составило  $11,59\pm 1,46$  у.е. (95% CI 11,37-11,81 у.е.), а по G хромосомам  $7,68\pm 1,47$  у.е. (95% CI 7,45-7,90 у.е.). Значения медиан также не отклонялись от среднего значения ( $Me=11,50$  у.е.;  $Me=7,68$  у.е.). Среднее количество активных рибосомных цистронов было равно  $8,63\pm 0,69$  у.е. (95% CI 8,53-8,73 у.е.), так же значение медианы не отклонялось от среднего значения ( $Me=8,50$  у.е.). Среднее число ассоциаций акроцентрических хромосом составило  $0,72\pm 0,30$  у.е. (95% CI 0,67-0,76 у.е.), значение медианы не отклонялось от среднего значения ( $Me=0,70$  у.е.). Среднее число акроцентрических хромосом, вступивших в ассоциации, было равно  $2,55\pm 0,75$  у.е. (95% CI 2,38-2,72 у.е.), значение медианы не отклонялось от среднего значения ( $Me=2,60$  у.е.). Среднее значение ассоциативного индекса было равно  $58,57\pm 24,80$  у.е. (95% CI 52,94-64,20 у.е.), так же значение медианы не отклонялось от среднего значения ( $Me=60,00$  у.е.).

Для сравнительного анализа комплекса показателей функциональной активности рибосомных генов в контрольной выборке и показателей комплекса функциональной активности рибосомных генов в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой использовали критерий Манна–Уитни для двух независимых групп. Статистически значимые различия между группой контроля и группой больных с первичной открытоугольной глаукомой наблюдались по показателям количества активных рибосомных цистронов:  $Z=3,14$   $p=0,001$  ( $Me=8,50$  у.е. и  $Me=7,40$  у.е.), так же статистически значимые различия существовали между показателями количества ассоциаций числа акроцентрических хромосом на клетку:  $Z=2,19$   $p=0,03$  ( $Me=0,70$  и  $Me=0,63$ ). При этом у больных первичной открытоугольной глаукомой выявлено снижение показателя ФАРГ количество активных рибосомных цистронов и повышение показателя количество ассоциаций акроцентрических хромосом по сравнению с контрольной группой. Значимых различий между двумя выборками по другим показателям функциональной активности рибосомных генов не выявлено.

Установлено, что статистически значимые различия между контрольной группой и выборкой больных первичной открытоугольной глаукомой существуют по количеству индивидов со средней копийностью рибосомных генов, в экспериментальной группе их процент был выше, чем в контрольной выборке. Полученные данные представлены в таблице 2.

Статистически значимых различий между медианными значениями и степенью варьирования показателей ФАРГ в группах мужчин и женщин не было выявлено ни в контрольной выборке, ни в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой.

Таблица 2

*Показатели распределения по копийности уровня ФАРГ в группе контроля и группе больных первичной открытоугольной глаукомой*

Копийность	Глаукома	%	Контроль	%	$\chi^2$	p	OR	95% CI
Низко-	55	24	65	31	1,75	0,19		
Средне-	130	58	101	47	4,31	<b>0,04*</b>	1,52	1,02-2,25
Высоко-	40	18	47	22	1,01	0,32		

\* статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Для установления более тонких механизмов функционирования аппарата транскрипции рибосомных генов нами был проведен корреляционный анализ парных внутри групповых взаимосвязей между показателями функциональной активности рибосомных генов в контрольной группе и в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой. При этом, цитогенетические характеристики образовывали ряд корреляционных связей на статистически значимом уровне, как в группе больных первичной открытоугольной глаукомой, так и в контрольной группе.

Так как распределение признаков в обеих группах было отличным от нормального, поэтому для анализа данных применяли метод расчета непараметрической корреляционной зависимости по Спирману

Как видно из таблиц 3 и 4, наиболее информативными цитогенетическими показателями являются показатель активности рибосомных генов по 10 хромосомам и генов локализованных в G-хромосомах. Данные показатели образовывали наибольшее число корреляционных связей на статистически значимом уровне.

Таблица 3

*Показатели парных корреляций в общей группе контроля*

показатели	ФАРГ10	ФАРГD	ФАРГG	РЦ	AcXp	XpAc	AI
<b>ФАРГ 10</b>	1,00						
<b>ФАРГD</b>	<b>0,59*</b>	1,00					
<b>ФАРГG</b>	<b>0,75*</b>	-0,02	1,00				
<b>РЦ</b>	<b>0,34*</b>	0,10	<b>0,34*</b>	1,00			
<b>AcXp</b>	<b>0,24*</b>	<b>0,16*</b>	<b>0,14*</b>	<b>0,36*</b>	1,00		
<b>XpAc</b>	<b>0,27*</b>	0,05	0,17	0,11	0,08	1,00	
<b>AI</b>	0,05	<b>0,19*</b>	0,04	<b>0,17*</b>	<b>0,62*</b>	<b>-0,24*</b>	1,00

\*-статистически значимые коэффициенты, ( $p < 0,05$ )

Таблица 4

*Показатели парных корреляций в общей выборке больных первичной открытоугольной глаукомой*

показатели	ФАРГ10	ФАРГD	ФАРГG	РЦ	AcXp	XpAc	AI
<b>ФАРГ 10</b>	1,00						
<b>ФАРГD</b>	<b>0,60*</b>	1,00					
<b>ФАРГG</b>	<b>0,70*</b>	-0,09	1,00				
<b>РЦ</b>	<b>0,39*</b>	<b>0,25*</b>	<b>0,29*</b>	1,00			
<b>AcXp</b>	0,13	0,11	0,10	<b>0,14*</b>	1,00		
<b>XpAc</b>	0,20	0,04	<b>0,27*</b>	-0,10	<b>0,55*</b>	1,00	
<b>AI</b>	0,18	0,00	<b>0,29*</b>	0,01	<b>0,89*</b>	<b>0,38*</b>	1,00

\*-статистически значимые коэффициенты, ( $p < 0,05$ )

В контрольной группе выявлены статистически значимые взаимосвязи между показателями общей ФАРГ с показателями ФАРГ по D- и G-хромосомам коэффициенты корреляции равны  $r=0,59$  и  $r=0,75$  соответственно, а также с показателем количества активных рибосомных цистронов ( $r=0,34$ ), количеством ассоциаций акроцентрических хромосом ( $r=0,24$ ) и количеством хромосом в ассоциациях ( $r=0,27$ ). В выборке больных первичной открытоугольной глаукомой обнаружены аналогичные статистически значимые взаимосвязи между показателями общей ФАРГ с показателями ФАРГ по D- и G-хромосомам ( $r=0,60$ ,  $r=0,70$ ) и количеством активных рибосомных цистронов ( $r=0,39$ ). При этом коэффициенты корреляции по D-хромосомам в двух выборках были равные, по G-хромосомам в контрольной группе коэффициент корреляции был выше, чем в группе «случай».

Коэффициент корреляции между количеством активных рибосомных цистронов в контрольной группе был ниже, чем в группе «случай». Статистически значимые взаимосвязи между показателями общей ФАРГ с количеством ассоциаций акроцентрических хромосом и количеством хромосом в ассоциациях в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой отсутствовали, в отличие от контрольной группы. В то же время в контрольной группе были обнаружены статистически значимые корреляционные связи показателя ФАРГ по D-хромосомам с показателем количества ассоциаций акроцентрических хромосом ( $r=0,16$ ) и ассоциативным индексом ( $r=0,19$ ). В группе «случай» такая связь на статистически значимом уровне не установлена. В то же время в группе больных первичной открытоугольной глаукомой обнаружены статистически значимые корреляционные связи показателя ФАРГ по D-хромосомам с количеством рибосомных цистронов ( $r=0,25$ ), которые отсутствовали в группе «контроль». В контрольной группе обнаружена взаимосвязь показателя ФАРГ по G-хромосомам с количеством активных рибосомных цистронов ( $r=0,34$ ) и показателями числа ассоциаций акроцентрических хромосом ( $r=0,14$ ). В группе «случай» также выявлена взаимосвязь показателя ФАРГ по G-хромосомам с количеством активных рибосомных цистронов ( $r=0,29$ ), при этом коэффициент корреляции в группе «случай» был ниже, чем в контрольной группе. Взаимосвязь данного показателя с показателем числа ассоциаций акроцентрических хромосом в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой не установлена. В то же время выявлены связи показателя ФАРГ по G-хромосомам с количеством хромосом в ассоциациях ( $r=0,27$ ) и ассоциативным индексом ( $r=0,29$ ), которые отсутствовали в контрольной группе. Так же выявлена статистически значимая связь количества активных рибосомных цистронов с количеством ассоциаций акроцентрических хромосом, как в контрольной группе, так и в группе «случай». При этом коэффициент корреляции в группе «контроль» был выше ( $r=0,36$ ), чем в группе «случай» ( $r=0,14$ ). В контрольной группе, в отличие от группы «случай» выявлена статистически значимая связь количества активных рибосомных цистронов с ассоциативным индексом ( $r=0,17$ ). Установлены статистически значимые корреляционные связи показателей ФАРГ количество ассоциаций акроцентрических хромосом и ассоциативным индексом, как в контрольной группе, так в группе «случай» коэффициенты корреляции равны соответственно  $r=0,62$  и  $r=0,89$ . В выборке больных глаукомой, в отличие от группы «контроль», установлена статистически значимая связь данного показателя еще и с количеством хромосом в ассоциациях ( $r=0,55$ ). Как в контрольной группе, так и в

группе «случай» выявлена статистически значимая связь числа акроцентрических хромосом, вступивших в ассоциации, с ассоциативным индексом, при этом коэффициент корреляции в контрольной группе был несколько ниже ( $r=0,24$ ), чем в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой ( $r=0,38$ ).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о вовлеченности белоксинтезирующего аппарата клетки в патогенетические механизмы формирования и развития первичной открытоугольной глаукомы.

## 2. Частоты аллелей и генотипов генов, регулирующих транскрипцию рибосомальных генов и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у здоровых и у больных ПОУГ жителей Курской области

Исследуемая выборка была подвергнута генотипированию по 4 полиморфизмам 4 генов факторов транскрипции рибосомных генов, таких как: TP53 (R72P), DNMT3B (C149T), POLR1B (S295L), TAF1B (A6S) и по 5 полиморфизмам 5 генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков: CYP1A1 (I462V), EPHX (H139R), GSTP1 (I105V), GSTM1 del/+ и GSTT1 del/+. Распределение частот генотипов данных полиморфизмов и их соответствие популяционному равновесию Харди –Вайберга (ХВ) проводилось отдельно в группах контроль и «случай». Полученные данные представлены в таблицах 5-8.

Таблица 5  
*Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генов факторов транскрипции рибосомных генов у здоровых людей*

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		$\chi^2$ , (p) <sup>2</sup>
			n	%	H <sub>0</sub>	H <sub>e</sub>	
TP53	R72P	72RR	33	40,2	0,488	0,457	p>0,05
		72 RP	40	48,8			
		72 PP	9	11,0			
DNMT3B	C149T	149CC	53	31,0	0,526	0,489	p>0,05
		149CT	90	52,6			
		149TT	28	16,4			
POLR1B	S295L	295 SS	34	18,5	0,641	0,500	14,71 (0.0001)
		295 SL	118	64,1			
		295 LL	32	17,4			
TAF1B	A6S	6AA	45	27,4	0,482	0,500	p>0,05
		6AS	79	48,2			
		6 SS	40	24,4			

H<sub>0</sub> наблюдаемая и H<sub>e</sub> ожидаемая гетерозиготность соответственно  
<sup>2</sup> уровни значимости p различий частот генотипов между группами, df=1  
 (p<0,05)

Как видно из таблицы 5, за исключением полиморфизма S295L гена POLR1B, генотипы всех ДНК маркеров, исследованных у здоровых индивидов находились в соответствии с равновесием Харди – Вайберга. Статистически значимое ( $p=0,0001$ ) отклонение распределение генотипов полиморфизма S295L POLR1B обусловлено повышением уровня наблюдаемой гетерозиготности ( $H_0 = 0,641$ ) по сравнению с ее ожидаемым уровнем ( $H_e = 0,500$ ).

В выборке людей больных глаукомой, как и в контрольной группе нами было обнаружено статистически значимое ( $p=0,02$ ) отклонение распределения генотипов полиморфизма S295L гена POLR1B и статистически значимое ( $p=0,002$ ) отклонение распределения генотипов полиморфизма C149T гена DNMT3B от равновесия Харди – Вайберга, которое было связано с повышением уровня наблюдаемой гетерозиготности ( $H_0=0,578$ ,  $H_e=0,579$ ) по сравнению с ее ожидаемым уровнем ( $H_e=0,500$ ,  $H_e=0,479$ ) (таблица 6). Генотипы других полиморфизмов генов факторов транскрипции РГ и генов ФБК находились в соответствии с РХВ (таблицы 7-8). Как известно, отклонения генотипических частот от РХВ в группе «случай» может быть связано с предрасположенностью к заболеванию или особенностью генораспределения в популяции [Feder J.N., 2006; Nielsen D.M., 1999].

Таблица 6

*Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генов факторов транскрипции рибосомных генов у больных с глаукомой*

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		$\chi^2, (p)^2$
			n	%	$H_0$	$H_e$	
TP53	R72P	72RR	51	44,3	0,461	0,440	p>0,05
		72 RP	53	46,1			
		72 PP	11	9,6			
DNMT3B	C149T	149CC	67	31,3	0,579	0,479	<b>9,41 (0,002)</b>
		149CT	124	58,0			
		149TT	23	10,7			
POLR1B	S295L	295 SS	42	20,4	0,578	0,500	<b>4,99 (0,02)</b>
		295 SL	119	57,8			
		295 LL	45	21,8			
TAF1B	A6S	6AA	42	21,0	0,550	0,500	p>0,05
		6AS	110	55,0			
		6 SS	48	24,0			

$H_0$  наблюдаемая и  $H_e$  ожидаемая гетерозиготность соответственно  
<sup>2</sup> уровни значимости  $p$  различий частот генотипов между группами,  $df=1$   
 $(p<0,05)$

Таблица 7

*Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генотипов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у здоровых людей*

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		$\chi^2_{(p)^2}$
			n	%	H <sub>0</sub> <sup>1</sup>	He <sup>2</sup>	
CYP1A1	I462V	462II	166	82,6	0,159	0,171	p>0,05
		462IV	32	15,9			
		462VV	3	1,5			
EPHX	H139R	139HH	121	61,1	0,354	0,334	p>0,05
		139HR	70	35,4			
		139RR	7	3,5			
GSTP	I105V	105II	88	45,4	0,454	0,435	p>0,05
		105IV	88	45,4			
		105VV	18	9,2			

<sup>1</sup>-H<sub>0</sub> наблюдаемая и <sup>2</sup>-He ожидаемая гетерозиготность соответственно

<sup>2</sup> уровни значимости p различий частот генотипов между группами, df=1 (p<0,05)

Таблица 8

*Распределение частот генотипов и значения гетерозиготности по полиморфным вариантам генотипов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных ПΟΥГ*

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Распределение генотипов		Уровень гетерозиготности		$\chi^2_{(p)^2}$
			n	%	H <sub>0</sub> <sup>1</sup>	He <sup>2</sup>	
CYP1A1	I462V	462II	180	83,7	0,144	0,165	p>0,05
		462IV	31	14,4			
		462VV	4	1,9			
EPHX	H139R	139HH	134	62,9	0,319	0,333	p>0,05
		139HR	68	31,9			
		139RR	11	5,2			
GSTP	I105V	105II	91	46,9	0,433	0,431	p>0,05
		105IV	84	43,3			
		105VV	19	9,8			

<sup>1</sup>-H<sub>0</sub> наблюдаемая и <sup>2</sup>-He ожидаемая гетерозиготность соответственно

<sup>2</sup> уровни значимости p различий частот генотипов между группами, df=1 (p<0,05)

### 3. Анализ ассоциаций аллелей и генотипов генов, регулирующих транскрипцию рибосомальных генов с предрасположенностью к первичной открытоугольной глаукоме

Следующим этапом настоящего исследования было изучение ассоциаций аллелей и генотипов генов факторов транскрипции РГ с риском развития глаукомы (таблица 9-10).

Как видно из таблиц 9-10 статистически значимых различий при сравнительном анализе частот аллелей и частот генотипов генов факторов транскрипции рибосомных генов между группами больных первичной открытоугольной глаукомой и здоровыми индивидами не выявлено.

Таблица 9

*Частоты аллелей полиморфных вариантов генов факторов транскрипции рибосомных генов у больных глаукомой и здоровых людей*

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	Аллели *	Частоты аллелей				Критерий различий $\chi^2, (p)^2$
			п	Больные глаукомой	п	Контрольная группа	
TP53	R72P	72R	115	0,674	82	0,646	p>0,05
		72 P		0,326		0,354	
DNMT3 B	C149T	149C	214	0,603	171	0,573	p>0,05
		149T		0,397		0,427	
POLR1B	S295L	295 S	206	0,493	184	0,505	p>0,05
		295 L		0,507		0,495	
TAF1B	A6S	6A	200	0,485	164	0,515	p>0,05
		6S		0,515		0,485	

\*Вариантные аллели представлены в нижних ячейках соответствующих полиморфизмов генов факторов транскрипции рибосомных генов

<sup>2</sup> уровни значимости p различий частот аллелей между группами, df=1 (p<0,05)

Таблица 10

*Сравнительный анализ частот генотипов полиморфных вариантов генов факторов транскрипции рибосомных генов больных глаукомой и здоровых*

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Частоты генотипов				$\chi^2, (p)^2$
			Контрольная группа		Больные глаукомой		
			п	%	п	%	
TP53	R72P	72RR	33	40,2	51	44,3	p>0,05



		72 RP	40	48,8	53	46,1	p>0,05
		72 PP	9	11,0	11	9,6	p>0,05
DNMT3B	C149T	149CC	53	31,0	67	31,3	p>0,05
		149CT	90	52,6	124	58,0	p>0,05
		149TT	28	16,4	23	10,7	p>0,05
POLR1B	S295L	295 SS	34	18,5	42	20,4	p>0,05
		295 SL	118	64,1	119	57,8	p>0,05
		295 LL	32	17,4	45	21,8	p>0,05
TAF1B	A6S	6AA	45	27,4	42	21,0	p>0,05
		6AS	79	48,2	110	55,0	p>0,05
		6 SS	40	24,4	48	24,0	p>0,05

<sup>2</sup> уровни значимости p различий частот генотипов между группами, df=1 (p<0,05)

#### **4. Анализ ассоциаций аллелей и генотипов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к первичной открытоугольной глаукоме**

В ходе исследования было проведено изучение ассоциаций аллелей и генотипов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития первичной открытоугольной глаукомы. В таблице 11 представлены частоты аллелей изучаемых полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и результаты их сравнительного анализа между группами больных первичной открытоугольной глаукомой и здоровых людей. Сравнительный анализ частот аллелей между группами больных первичной открытоугольной глаукомой и контрольной группой не выявил ассоциации генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к заболеванию.

Как известно, анализ ассоциации аллелей генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков не дает полного представления о взаимосвязи рассматриваемых полиморфизмов с предрасположенностью к первичной открытоугольной глаукоме, поэтому были исследованы влияния генотипов ферментов биотрансформации ксенобиотиков на риск развития ПОУГ.

В таблице 12 представлены результаты сравнительного анализа частот генотипов ферментов биотрансформации ксенобиотиков между группами больных первичной открытоугольной глаукомой и здоровыми.

Как видно из таблицы 12, наиболее выраженные различия между группами больных первично открытоугольной глаукомой и здоровыми людьми были обнаружены по делеционному полиморфизму гена GSTT1. Так гомозиготный генотип del/del GSTT1 среди больных первичной открытоугольной глаукомой встречался у 31,2%, а в контрольной группе у 49,2% ( $\chi^2 = 12,02$ ; p=0,001). Таким образом, генотип del/del GSTT1 был ассоциирован с пониженным риском развития первичной открытоугольной глаукомы (OR=0,5; 95% CI 0,3-0,73;).

Статистически значимых различий при сравнительном анализе частот генотипов других генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков между группами больных глаукомой и здоровыми не выявлено.

Таблица 11

Частоты аллелей полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных ПОУГ и здоровых людей

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	Аллели*	Частоты аллелей				$\chi^2, (p)^2$
			п	Больные глаукомой	п	Контрольная группа	
CYP1A1	I462V	462I	215	0,909	201	0,905	p>0,05
		462V		0,091		0,095	
EPHX	H139R	139H	213	0,789	198	0,788	p>0,05
		139R		0,211		0,212	
GSTP	I105V	105I	194	0,686	194	0,680	p>0,05
		105V		0,314		0,320	

\* Вариантные аллели представлены в нижних ячейках соответствующих полиморфизмов генов факторов транскрипции рибосомных генов.

<sup>2</sup> уровни значимости p различий частот аллелей между группами, df=1 (p<0,05)

Таблица 12

Сравнительный анализ частот генотипов полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков больных ПОУГ и здоровых

Ген	Полиморфизм и его локализация в гене	генотип	Частоты генотипов				$\chi^2, (p)^2$
			Контрольная группа		Больные глаукомой		
			п	%	п	%	
CYP1A1	I462V	462II	166	82,6	180	83,7	p>0,05
		462IV	32	15,9	31	14,4	p>0,05
		462VV	3	1,5	4	1,9	p>0,05
EPHX	H139R	139HH	121	61,1	134	62,9	p>0,05
		139HR	70	35,4	68	31,9	p>0,05
		139RR	7	3,5	11	5,2	p>0,05
GSTP	I105V	105II	88	45,4	91	46,9	p>0,05
		105IV	88	45,4	84	43,3	p>0,05
		105VV	18	9,2	19	9,8	p>0,05
GSTM1	del/+	del	88	49,2	91	45,7	p>0,05
		+	91	50,8	108	54,3	
GSTT1	del/+	del	88	49,2	62	31,2	<b>12,02 (0,001)</b>
		+	91	50,8	137	68,8	

<sup>2</sup> уровни значимости p различий частот генотипов между группами, df=1 (p<0,05)

## **5. Анализ влияния полиморфизмов генов факторов транскрипции рибосомных генов и генов ФБК на показатели функциональной активности рибосомных генов**

В ходе нашего исследования было изучено модифицирующее влияние генотипов факторов транскрипции рибосомных генов на показатели ФАРГ в выборке больных глаукомой и контрольной группе. Было установлено, что только полиморфизм С149Т гена DNMT3B оказывает влияние на показатель ФАРГ отражающий количество рибосомных цистронов в группе «контроль» ( $p=0,04$ ). При этом у гомозиготных по мутантному аллелю гена DNMT3B индивидов показатель ФАРГ количество рибосомных цистронов выше, чем у индивидов гомозиготных по дикому аллелю и гетерозигот. Влияние других полиморфизмов факторов транскрипции рибосомных генов на функциональную активность рибосомных генов не выявлено ни у больных глаукомой, ни в контрольной группе.

В ходе настоящего исследования было изучено модифицирующее влияние генотипов ферментов биотрансформации ксенобиотиков на показатели ФАРГ в рассматриваемых выборках. Установлено, что в контрольной группе полиморфизм I462V гена CYP1A1 оказывает влияние на показатель активности РГ по 10 хромосомам ( $p=0,04$ ) и хромосомам группы G ( $p=0,03$ ). При этом ФАРГ по 10 хромосомам и хромосомам группы G у гомозигот по мутантному аллелю ниже, чем у гетерозигот и гомозигот по дикому аллелю. Полиморфизм I105V гена GSTP был ассоциирован с числом акроцентрических хромосом, вступивших в ассоциации ( $p=0,01$ ). Также у гомозигот по мутантному аллелю этот показатель был ниже, чем у гетерозигот и гомозигот по дикому аллелю. Полиморфизм гена GSTT1 был ассоциирован с показателями ФАРГ отражающим количество рибосомных цистронов ( $p=0,05$ ). У носителей делеционного аллеля показатель ФАРГ по количеству рибосомных цистронов был выше.

В выборке больных глаукомой только полиморфизм гена GSTT1 был ассоциирован с показателями ФАРГ по хромосомам группы D ( $p=0,01$ ). У носителей делеционного аллеля показатель ФАРГ был выше по сравнению с общей группой. Влияние полиморфизмов I462V гена CYP1A1, H139R гена EPHX1, I105V гена GSTP, del/+ гена GSTM1 на функциональную активность рибосомных генов не установлено.

С целью выявления особенностей взаимосвязи парных сочетаний полиморфизмов генов факторов транскрипции РГ и ферментов детоксикации с показателями комплекса ФАРГ был проведен двухфакторный дисперсионный анализ в выборке больных первичной открытоугольной глаукомой и контрольной группе.

Для выборки больных с первичной открытоугольной глаукомой статистически значимые взаимосвязи были выявлены для показателя функциональной активности рибосомных генов по хромосомам группы D. Их формировали сочетания полиморфизмов генов DNMT 3B C149T / GSTM1 del/+ ( $F(2, 190)=4,69, p=0,01$ ) и TAF 1B A6C / EPHX1 H139R ( $F(4, 183)=2,94, p=0,02$ ). При этом этот показатель ФАРГ был ниже при сочетании гомозиготного генотипа по мутантному аллелю гена DNMT 3B C149T и +/+ GSTM1 del/+, а также при сочетании гомозиготных генотипов по мутантному аллелю генов TAF 1B A6C и EPHX1 H139R.

Таким образом, при возникновении мутаций в этих генах происходит снижение ФАРГ по хромосомам группы D.

На формирование показателя количества активных рибосомных цистронов у больных с ПОУГ оказывало влияние сочетание DNMT 3B C149T / GSTM1 del/+ (F(2, 190)=3,03, p=0,05) при  $R^2_1=0,06$ . Понижение этого показателя выявлено при сочетании гетерозиготного генотипа гена DNMT 3B C149T и del/del GSTM1 del/+. Также статистически значимые ассоциации обнаружены для показателя количества хромосом в ассоциациях. Их формировали сочетания полиморфизмов генов TAF 1B A6C / GSTM1 del/+ (F(2, 31)=4,86, p=,02) и GSTM1 del/+ GSTT1del/+ (F(1, 34)=7,56, p=0,01). При сочетании гомозиготного генотипа по мутантному аллелю гена TAF 1B A6C и del/ del GSTM1 del/+ и при сочетании генотипов del/del GSTM1 del/+ и del/del GSTM1 del/+ выявлено снижение показателя ФАРГ количества хромосом в ассоциациях.

В группе контроль статистически значимые взаимосвязи были выявлены для показателя функциональной активности рибосомных генов по хромосомам группы G, их формировали сочетания полиморфизмов генов CYP1A1 I462V / GSTT1del/+, F(2, 121)=4,04, p=,02. При этом сочетание гомозиготного генотипа по мутантному аллелю гена CYP1A1 I462V и +/+ GSTT1del/+ приводит к снижению этого показателя. На формирование показателя количества активных рибосомных цистронов в контрольной группе оказывало влияние сочетание PP гена Trp53 R72P и CC гена DNMT 3B C149T (F(4, 98)=2,66, p=,04); TT гена DNMT 3B C149T и AS гена TAF 1B A6S (F(4, 167)=3,38, p=,01); VV гена CYP1A1 I462V и +\+ GSTT1del/+ (F(2, 121)=4,35, p=,015); del/ del гена GSTT1del/+ и IV гена GSTP I105V (F(2, 120)=3,62, p=,03, среднее количество ассоциаций акроцентрических хромосом (комбинации CC гена DNMT3B C149T и del/del гена GSTT1del/+, F(2, 119)=3,08, p=,05, а также количество хромосом, вступивших в ассоциации (комбинация PP гена Trp53 R72P и AA гена TAF 1B A6C, F(4, 84)=3,67, p=0,01). Все эти сочетания приводят к снижению показателей ФАРГ.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В связи с тем, что глаукома занимает второе место среди заболеваний, приводящих к слепоте, изучение этиопатогенеза и клинических проявлений различных нозологических вариантов глауком составляет одну из наиболее актуальных проблем офтальмологии. [Founti, P., Topouzis, F, 2009].

Так как ФАРГ вносит базовый вклад в формирование общего уровня синтетических процессов в клетке, и в определенной степени корректируется системой биотрансформации ксенобиотиков, то проблема оценки их вовлеченности в развитие глаукомы является одной из актуальных для молекулярной генетики. Данные гены и их полиморфизмы были выбраны в рамках эколого-токсико-генетической концепции мультифакториальных заболеваний, разработанной на кафедре биологии, медицинской генетике и экологии КГМУ

Настоящее исследование представляет собой первую работу, посвященную комплексному изучению вклада функциональной активности рибосомных генов через анализ взаимосвязи с генами факторами транскрипции рибосомных генов и генами ФБК в формирование одной из наиболее распространенных офтальмопатологий среди жителей Курской области. Полученные результаты демонстрируют принцип, по которому происходит согласование работы комплекса функциональной активности рибосомных генов.

## ВЫВОДЫ

1. У больных первичной открытоугольной глаукомой уровень ФАРГ не отличается от такового у здоровых жителей Курской области. Общий уровень ФАРГ при этом у больных ПОУГ составил  $19,24 \pm 1,77$  у.е. и варьировал от 18,00 до 20,40 у.е., а у здоровых  $19,23 \pm 2,11$  у.е. и варьировал от 17,75 до 20,70 у.е.

2. У больных первичной открытоугольной глаукомой выявлено снижение показателя ФАРГ по количеству активных рибосомных цистронов и повышение показателя количество ассоциаций акроцентрических хромосом в сравнении со здоровыми индивидами. Среди больных ПОУГ количество индивидов со средней копийностью РГ превышало контроль.

3. Впервые установлены частоты аллелей и генотипов генов, регулирующих транскрипцию рибосомальных генов и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков для больных первичной открытоугольной глаукомой и здоровых жителей Курской области.

4. Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов 4 полиморфизмов генов регулирующих транскрипцию рибосомальных генов, таких как: TP53 (R72P), DNMT3B (C149T), POLR1B (S295L), TAF1B (A6S) между группами больных глаукомой и контрольной группой не выявил ассоциации этих генов с предрасположенностью к заболеванию.

5. Анализ ассоциаций аллелей и генотипов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков показал что, только делеционный генотип del/del GSTT1 снижает риск возникновения заболевания первичной открытоугольной глаукомы.

6. Установлено, что только мутантный полиморфизм гена DNMT3B оказывает влияние на показатель ФАРГ отражающий количество рибосомных цистронов в группе «контроль» ( $p=0,04$ ). Влияние других полиморфизмов факторов транскрипции рибосомных генов на функциональную активность рибосомных генов не выявлено ни у больных глаукомой, ни в контрольной группе.

7. Доказано влияние мутантных генотипов полиморфизмов генов ФБК на активность РГ: CYP1A1, оказывает влияние на показатель активности РГ по 10 хромосомам и хромосомам группы G, GSTP был ассоциирован с числом акроцентрических хромосом, вступивших в ассоциации, GSTT1 был ассоциирован с показателями ФАРГ отражающим количество рибосомных цистронов. В выборке больных глаукомой только полиморфизм гена GSTT1 был ассоциирован с показателями ФАРГ по хромосомам группы D.

8. Выявлено влияния на показатели комплекса функциональной активности рибосомных генов парных сочетаний полиморфизмов рассматриваемых генов. Для выборки больных глаукомой это сочетания полиморфизмов генов DNMT 3B C149T / GSTM1 del/+ и TAF 1B A6C / EPHX1 H139R на показатель функциональной активности рибосомных генов по хромосомам группы D; сочетание DNMT 3B C149T / GSTM1 del/+ - на количество активных рибосомных цистронов; сочетания полиморфизмов генов TAF 1B A6C / GSTM1 del/+ и GSTM1 del/+ / GSTT1 del/+ - на показатель количество хромосом в ассоциациях. В группе контроль: сочетание полиморфизмов генов CYP1A1 I462V / GSTT1 del/+ на показатель функциональной активности рибосомных генов по хромосомам группы G; сочетание полиморфизмов генов TP53 R72P / DNMT 3B C149T; DNMT 3B C149T / TAF 1B A6C;

CYP1A1 I462V/ GSTT1 del/+; GSTT1 del/+ / GSTP I105V на показатель количество активных рибосомных цистронов; сочетание DNMT3B C149T / GSTT1 del/+ - среднее количество ассоциаций акроцентрических хромосом, комбинация Trp53 R72P / TAF1B A6C – на количество хромосом, вступивших в ассоциации.

## СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В., Стабровская Н.В., Барков А.Н. Изучение кластеров рибосомных генов // Материалы международной научно-практической конференции: Теоритические и прикладные проблемы социально-правовых, медико-биологических и технико-экономических сфер жизни общества. Курск, РГСУ, 2008 год. – с.70.
- 2) Иванов В.П., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Борзилов Е.Е., Кохтенко Е.В. Сравнение показателей функциональной активности рибосомных генов при различных заболеваниях человека с показателями по общей популяции Курской области // Материалы международной научно-практической конференции: Теоритические и прикладные проблемы социально-правовых, медико-биологических и технико-экономических сфер жизни общества. Курск, РГСУ, 2008 год. – с.73-74.
- 3) Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В., Стабровская Н.В., Барков А.Н. Структурная организация рибосомных генов // Университетская наука: Теория, практика, инновации. Сборник трудов 73-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН. В 3-х томах – Курск, 2008. – Т1. – С.470 - 473.
- 4) Иванов В.П., Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В. Факторы, регулирующие транскрипцию рибосомных генов // Университетская наука: Теория, практика, инновации. Сборник трудов 73-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН. В 3-х томах – Курск, 2008. – Т1. – С. 411 – 413
- 5) Иванов В.П., Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В., Стабровская Н.В., Барков А.Н. Активаторы транскрипции рибосомных генов // Университетская наука: Теория, практика, инновации. Сборник трудов 73-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН. В 3-х томах – Курск, 2008. – Т1. – С.470 - 473.
- 6) Иванов В.П., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Барков А.Н. Кохтенко Е.В. Модифицирующее действие рибосомных генов при различных патологиях у человека// Университетская наука: Теория, практика, инновации. Сборник трудов 73-й научной конференции КГМУ и сессии Центрально-Черноземного научного центра РАМН. В 3-х томах – Курск, 2008. – Т1. – С. 411 – 413
- 7) Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Кохтенко Е.В., Барков А.Н. Особенности изучения функциональной активности рибосомных генов с помощью окраски азотнокислым серебром // Оптимизация образовательного и лечебно-диагностического процесса: Сб. науч. тр. – Курск: МУ издательский центр «ЮМЭКС», 2008.-112 с.
- 8) Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В., Стабровская Н.В., Барков А.Н.Эпигенетическая регуляция рибосомных генов // Оптимизация образовательного и лечебно-диагностического процесса: Сб. науч. тр. – Курск: МУ издательский центр «ЮМЭКС», 2008.-112 с.
- 9) Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В., Стабровская Н.В., Барков А.Н., Саид А.Д. Цитогенетические методы изучения мутагенности экзогенных факторов// Оптимизация образовательного и лечебно-диагностического процесса: Сб.

- науч. тр. – Курск: МУ «издательский центр «ЮМЭКС», 2008.-112 с.
- 10) Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В., Куприянова Я.С., Шейнов А.И., Булгакова И.В. /Однонуклеотидный полиморфизм в геноме человека – важный объект молекулярно-генетических исследований в медицинской генетике// Materialy IV mezinarodnivedecko – praktickaconference “Vedaatechnologie: krok do budoucnosti-2008” – Dil 15. Chemie a chemickatechnologie: Praha. Publishing House “Education and Science: s.r.o. -104 s.
  - 11) Трубникова Е.В., Кохтенко Е.В., Барков А.Н., Саид А.Д. РНК-полимераза 1-фактор транскрипции рибосомных генов // Молодежная наука и современность: от фундаментальной идеи до инновационных проектов.73-я итоговая межвузовская конференция студентов и молодых ученых. 15-16 апреля 2008 года. В 2-х частях. Часть 1.- Курск: ГОУ ВПО КГМУ Росздрава, 2008 -348 с.
  - 12) Борзилов Е.Е., Иванов В.П., Полоников А.В., Переверзева Е.А., Кохтенко Е.В., Булгакова И.В., Тевс Д.С.// Связь полиморфизма E158K гена флавиносодержащей монооксигеназы-3 с тяжестью двигательных нарушений у детей с церебральным параличом// Медицинская генетика. 2010. Т. 9. № 10. С. 35-38.
  - 13) Polonikov AV, Yarosh SL, Kokhtenko EV, Starodubova NI, Pakhomov SP, Orlova V// The functional genotype of glutathione S-transferase T1 gene is strongly associated with increased risk of idiopathic infertility in Russian men.// Fertility and Sterility (USA). 2010. Vol.94(3), P.1144-1147
  - 14)Иванов В.П., Трубникова Е.В., Горяинова Н.В., Брежнев А.Ю., Кохтенко Е.В., Рыжаева В.Н. Показатели комплекса функциональной активности рибосомных генов при глаукоме // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012 г.
  - 15) Полоников А.В., Ярош С.Л., Кохтенко Е.В., Стародубова Н.И., Пахомов С.П., Орлова В.С.Изучение роли полиморфизмов Y113H и H139R гена митохондриальной эпоксидгидролазы в детерминации идиопатического бесплодия и нарушений сперматогенеза у мужчин// Курский научно-практический вестник"Человек и его здоровье". Научно-практический журнал Курского государственного медицинского университета, Центрально-Черноземного научного центра РАМН, Курского регионального отделения РАЕН. №4 - 2009 Год
  - 16) Чияла Р, Климова Е.А., Кохтенко Е.В. научный руководитель Трубникова Е.В. Анализ распространенности полиморфизма гена белка р 53 в курской популяции при различных мультифакториальных заболеваниях// проблемы и перспективы развития современной медицины. Сборник научных статей IV Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых. Гомель, 2012 №4
  - 17) Кохтенко Е.В., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Чияла Р. Ассоциация полиморфизма C149T гена DNMT3B с предрасположенностью к глаукоме //Материалы 77-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: Молодежная наука и современность. Курск, 2012 г.



- 18) Барышев А.С., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Винников В.И., Кохтенко Е.В. Полиморфизм гена EPHX (TYR113HIS) в популяции Курской области// Материалы 77-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: Молодежная наука и современность. Курск, 2012 г.
- 19) Храмцов А.В., Иванов В.П., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В., Кохтенко Е.В. Многомерный анализ функциональной активности рибосомных генов при хронической обструктивной болезни легких// Фундаментальные исследования №5, 2012.
- 20) Стабровская Н.В., Иванов В.П., Трубникова Е.В., Брежнев А.Ю., Кохтенко Е.В., Белоус А.С., Храмцов А.В., Нескородова Н.Ю., Винников В.И. Полиморфизм генов глутатион s-трансфераз у больных глаукомой в курской популяции // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4
- 21) The role of hereditary component in the origin of cerebral palsies /E.V. Trubnikova, V.P. Ivanov, A.S. Belous, A.P. Maslov, E.V. Kohtenko, E.E. Borzilov, N.V. Stabrovskaya, A.N. Barkov, I.I. Bart // Internationaler Medizinischer Kongress «Euromedica Hannover» (4-5 Juni 2009) – Programm Abstracts. – Hannover, 2009. – P. 83-84.
- 22) Особенности функциональной активности рибосомных генов у людей с различными вариантами генотипов гена DNMT149 / Е.В. Кохтенко, Е.В. Трубникова, Н.В. Стабровская, В.Н. Рыжаева, А.С. Белоус, А.Н. Барков, А.Ю. Брежнев, Е.Е. Борзилов // Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г.). – Ростов н/Д, 2010. – С. 94.

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

РГ – рибосомные гены  
у.е. – условные единицы  
ФАРГ – функциональная активность рибосомных генов  
ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома  
РХВ - равновесие Харди-Вайнберга  
ФАРГ 10 –рибосомные гены 10 акроцентрических хромосом  
ФАРГD – рибосомные гены хромосом группы D  
ФАРГG – рибосомные гены хромосом группы G  
РЦ - количество активных рибосомных цистронов  
AcXp - число ассоциаций акроцентрических хромосом  
XpAc - число хромосом, вступивших в ассоциации  
АИ - ассоциативный индекс  
Trp53 (R72P) - опухолевый белок p53  
DNMT 3B (C149T) - ДНК (цитозин-5) – метилтрансфераза 3 бета  
TAF 1B (A6C) - ТАТА-бокс связывающий белок (TBP) – ассоциированный фактор  
POLR1B (S295L) - РНК-полимераза I  $\beta$  субъединица  
EPHX1 (H139R) – эпоксидгидролаза 1 типа, микросомальная  
GSTM1 (0/+) - глутатион-S-трансфераза, класс  $\mu$ , изоформа 1  
GSTT1 (0/+) - глутатион-S-трансфераза, класс  $\theta$ , изоформа 1  
GSTP1 (I105V) - глутатион-S-трансфераза, класс  $\pi$ , изоформа 1  
CYP1A1 (I462V) – цитохром P-450, семейство A, подсемейство I, полипептид I

**Кохтенко Елена Васильевна (Россия)**

*«Функциональная активность рибосомных генов, полиморфизм генов факторов их транскрипции и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных первичной открытоугольной глаукомой»*

Исследование посвящено изучению вовлеченности белоксинтезирующего аппарата клетки в патогенетические механизмы формирования и развития первичной открытоугольной глаукомы. Рассмотрены основные показатели комплекса функциональной активности рибосомных генов: суммарный уровень по 10 хромосомам, уровень по хромосомам D и G, количество активных рибосомных цистронов, количество ассоциаций хромосом и хромосом в ассоциациях. У больных первичной открытоугольной глаукомой в сравнении с выборкой здоровых жителей Курской области выявлены изменения показателей функциональной активности рибосомных генов. Проведен комплексный молекулярно-генетический анализ вовлеченности генов факторов транскрипции рибосомных генов и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков в формирование предрасположенности к первичной открытоугольной глаукоме. Установлена роль полиморфизмов этих генов, а также их парных сочетаний в формировании показателей функциональной активности рибосомных генов у больных первичной открытоугольной глаукомой. Работа расширит представления о взаимосвязях цитогенетических и молекулярно-генетических механизмов при открытоугольной глаукоме.

**Kohtenko Elena Vasilievna (Russia)**

*The functional activity of ribosomal genes, the genes polymorphism of their transcription factors and the genes polymorphism of xenobiotics biotransformation enzymes at patients with primary open-angle glaucoma*

The research was dedicated to studying of the functional activity of ribosomal genes involvement in the pathogenesis' mechanisms of the formation and the development of the open-angle glaucoma. The basic measures of the functional activity of ribosomal genes complex (the total level of 10 chromosomes, the levels of D and G chromosomes, the quantity of the active ribosomal cystrones, the quantity of the chromosomes associations and the chromosomes in associations) were studied. The changes of the measures of the functional activity of ribosomal genes were detected at the patients with the open-angle glaucoma comparing with the Kursk control group. The molecular-genetic analysis of the genes polymorphism of their transcription factors and the genes polymorphism of xenobiotics biotransformation enzymes involvement in the formation of predisposition to the open-angle glaucoma was done. The role of these genes polymorphisms and their pair combinations in the formation the measures of the functional activity of ribosomal genes was installed at the patient with the open-angle glaucoma. This work will extend representation about the correlation of cutogenetic and molecular-genetic mechanisms at the open-angle glaucoma.

**КОХТЕНКО ЕЛЕНА ВАСИЛЬЕВНА**

**Функциональная активность рибосомных генов, полиморфизм генов факторов их транскрипции и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных первичной открытоугольной глаукомой**

Автореферат

Лицензия ИД №6248 от 12.11.2001

Подписано в печать 06.03.2013 г.  
Формат 60x84/16 Объем 2,7п.л.  
Печать офсетная. Бумага офсетная.  
Тираж 100 экз. заказ 36

Отпечатано в ООО «учитель» г.Курск, ул. Садовая 31

