

На правах рукописи



БЕЛУГИН Дмитрий Александрович

**ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И ЕГО ВКЛАД В
ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ
МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2006

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Курский государственный университет» и Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и соцразвитию»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Иванов Владимир Петрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Асанов Алий Юрьевич

доктор биологических наук, профессор

Спицын Виктор Алексеевич

Ведущая организация:

Российский государственный медицинский университет

Защита диссертации состоится 22 ноябрь 2006 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.05 при ГОУ ВПО Российской университет дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов по адресу:

117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Автореферат разослан « » 2006 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук, доцент

О.Б. Гигани

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Цитокины являются полипотентными веществами белковой природы, обладающими множественными биологическими эффектами. Они представляют собой трансмиттеры межклеточных взаимодействий, с их помощью осуществляется контроль большинства физиологических процессов (Cohen M.C., Cohen S., 1996; Кашкин К.П., 1998). Обладая значительной вариабельностью, гены цитокинов характеризуются наличием однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с изменением синтеза биохимических продуктов (Коненков В.И., Смольникова М.В., 2003). Данные полиморфизмы представляют собой удобный объект исследований, позволяющий выявить связь генов, в которых они локализованы, с регуляцией тех или иных физиологических процессов (Авдошина В.В., Коненков В.И., 2004).

В последнее время является общепризнанной роль цитокинов в регуляции пролиферации и дифференциации эритроидных клеток-предшественников (Smithgall T.E., 1998; Гольдберг Е.А., с соавт., 2001). В процессе эритропозза формируется специфическая структура эритроцитарной мембранны, которая является одним из главнейших критериев зрелости эритроидных клеток, от нее во многом зависит нормальное функционирование циркулирующих эритроцитов (Сторожок С.А., с соавт., 1997). Сложная структурная организация цитоплазматических мембран эритроцитов во многом определяются белковыми молекулами, являющимися их важнейшими компонентами (Артюхов В. Г., Наквасина М. А. 2000; Иванов В.П., с соавт., 2004). Будучи тесно связанными друг с другом в структуре мембраны, белки демонстрируют взаимозависимость их количественного содержания (Иванов В.П., с соавт., 2004). Это приводит к тому, что в ответ на изменение продукции одного белка может наблюдаться изменение содержания в мембране целого ряда других белков, и, как следствие, - нарушение выполнения своих функций как мембраной, так и всей клеткой, что, в свою очередь, может быть причиной развития патологических состояний. Изложенное подтверждается результатами исследований вовлеченностя клеточных мембран в патогенез ряда наследственных заболеваний (Прахин Е.И., с соавт., 1997; Гейченко В.П., с соавт., 2001). В этой связи представляется важным изучение генетического контроля за формированием белковых структур мембран эритроцитов, который осуществляется не только конкретными генами, кодирующими определенные мембранные белки, но и включает в себя массу факторов, регулирующих их экспрессию, посттрансляционную модификацию, а также процесс включения белков в состав мембраны (Laurence H.J., et al., 1994; Gallagher P.G., et al., 1998; Takakuwa Y., 2000; Jourdi H., et al., 2005; Manno S., et al., 2005).

Одними из наиболее вероятностных факторов, участвующих в регуляции формирования белковой структуры клеточных мембран, представляются цитокины, проявляющие свои свойства на всех этапах созревания эритроидных клеток (Smithgall T.E., 1998; Socolovsky M., et al.,

1998; Захаров Ю.М., Рассохин А.Г., 2002). Однако этот аспект их влияния на эритропоэз еще не получил должного освещения, что и определило проведение настоящего исследования.

Цель исследования. Целью настоящей работы явилось изучение популяционных особенностей распределения полиморфизма генов цитокинов и оценка его вклада в вариабельность количественного содержания основных белков мембран эритроцитов человека.

Задачи исследования.

1. Исследовать распределение однонуклеотидных полиморфизмов шести генов цитокинов по одиннадцати точечным заменам (-511C/T *IL-1 β* ; S27P и -16T/C *IL-3*; -174G/C *IL-6*; T113M *IL-9*; L10P, R25P и -509C/T *TGF β 1*; -308G/A, -238G/A и -863C/A *TNF α*) среди населения Курской области и сопоставить его с распределением одноименных полиморфизмов среди других российских и мировых популяций;

2. Изучить количественное содержание основных белков мембран эритроцитов у человека и особенности их вариабельности у мужчин и женщин;

3. Выявить ассоциации отдельных ДНК-полиморфизмов генов цитокинов с особенностями количественного содержания мембранных белков эритроцитов;

4. Провести анализ взаимосвязи полиморфных вариантов генов цитокинов с характером взаимного варьирования количественного содержания компонентов белкового спектра мембран эритроцитов;

5. Оценить степень генетической детерминации количественного содержания фракций исследуемых белков мембран эритроцитов;

6. Определить вклад аллельного полиморфизма генов цитокинов в формирование фенотипической вариабельности количественного содержания белков эритроцитарных мембран.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование 11 полиморфизмов 6 генов цитокинов, вовлеченных в регуляцию эритропоэза у человека. В результате исследования получены новые данные о влиянии полиморфизмов генов цитокинов на формирование количественной представительности основных белков мембран эритроцитов человека. Оценен вклад аллельных вариантов в формирование общей фенотипической и генетически обусловленной дисперсии количественной представительности отдельных белковых фракций эритроцитарных мембран. Установлена связь отдельных полиморфных вариантов генов цитокинов с количественным содержанием основных белковых продуктов, входящих в состав мембран эритроцитов. Полученные данные о сопряженности генетического полиморфизма цитокинов с характером взаимного варьирования количественного содержания мембранных белков эритроцитов расширяют представления о роли генетических факторов в формировании белковой структуры эритроцитарных мембран.

Научно-практическое значение. Результаты работы представляют практический интерес для клеточной биологии, цитологии, молекулярной,

клеточной и популяционной генетики, биоинформатики, нормальной физиологии человека, биохимии, гематологии и других научных дисциплинах. Они могут быть использованы в учебных процессах в высших учебных заведениях на соответствующих кафедрах.

Полученные данные создают основу для более глубокого понимания молекулярно-генетических механизмов регуляции биосинтеза белков мембран эритроцитов и открывают перспективы для разработки методов управления экспрессией их генов при различных заболеваниях человека. Результаты исследования могут найти применение в цитокиновой и антицитокиновой терапии, расширяя представления о вероятных побочных эффектах названных методов лечения.

Положения, выносимые на защиту.

1. В популяции Курской области гены цитокинов характеризуются значительной вариабельностью: оценки частот аллелей рассмотренных генетических вариантов лежат в пределах от 2.4% для -238G/A до 44% для -174G/C, что позволяет рассматривать изменчивость названных генов как полиморфизм, а не мутации.

2. Частоты аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов генов цитокинов в популяции Курской области отличаются от частот соответствующих аллелей и генотипов в других российских и мировых популяциях и этнических группах.

3. Индивиды, обладающие разными полиморфными вариантами генов цитокинов, характеризуются определенными различиями в количественном содержании и фенотипической вариабельности основных мембранных белков эритроцитов.

4. Носители разных полиморфных вариантов генов цитокинов отличаются особенностями взаимного варьирования у них количественного содержания основных мембранных белков эритроцитов.

5. Полиморфизм генов цитокинов вносит вклад в формирование вариабельности количественного содержания основных мембранных белков эритроцитов, определяя от 0,45% дисперсии 2.3-анкирина до 6.91% дисперсии АТБ.

Апробация работы и публикации. Результаты работы представлены на 70-й и 71-й итоговых научных конференциях КГМУ и сессиях Центрально-Черноземного научного центра РАМН (Курск, 2005, 2006), XII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва, 2005), V съезде Российского общества медицинских генетиков (Уфа, 2005), научных конференциях студентов и молодых ученых КГМУ (Курск, 2005, 2006), Всероссийском научном симпозиуме с международным участием «Цитокины. Стволовая клетка. Иммунитет» (Новосибирск, 2005), IV международной научно-практической конференции «Динамика научных достижений – 2005» (Днепропетровск, 2005), Российской научной конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (Курск, 2006), научной конференции «Интеграция медицины и образования» (Курск,

2006), V Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых ученых и студентов по медицине (Тула, 2006). По материалам исследования опубликовано 19 работ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, включает в себя 12 таблиц, 6 рисунков. Состоит из списка сокращений, введения, 6 глав, заключения, выводов и 12 приложений. Библиографический список включает 360 источников, из них 94 отечественных и 266 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования. Материалом настоящего исследования в рамках популяционного анализа послужила случайная выборка из жителей Курской области, представленная 340 добровольцами. Количественное содержание мембранных белков эритроцитов определялось у 182 человек. Основными критериями при формировании выборки были: отсутствие у обследованных клинических проявлений соматопатологий, русская национальность, отсутствие родства между индивидами. Кроме того, для расчета коэффициента наследуемости были взяты образцы крови 47 родственников I ступени родства.

Исследовали 11 полиморфных вариантов 6 генов цитокинов: интерлейкинов (IL) -1 β , -3, -6, -9, трансформирующего фактора роста $\beta 1$ ($TGF\beta 1$), фактора некроза опухоли α ($TNF\alpha$) (таблица 1).

Методы исследования. *Молекулярно-генетические методы.* Выделение ДНК производили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции из замороженной венозной крови (Маниатис Т., с соавт., 1984). Амплификацию фрагментов ДНК осуществляли методом полимеразной цепной реакции. Генотипирование продуктов амплификации путем ПДРФ-анализа проводили с использованием опубликованных методик или методик, разработанных на кафедре медицинской биологии, генетики и экологии

Таблица 1

Исследованные полиморфизмы генов цитокинов

Название гена	Хромосомная локализация	Полиморфизм	Локализация в гене
IL-1 β	2q14	-511 C/T	5'UTR
IL-3	5q31.1	S27P	1 экзон
		-16C/T	5'UTR
IL-6	7p21	-174 G/C	5'UTR
IL-9	5q31.1	T113M	5 экзон
TGF $\beta 1$	19q13.1	L10P	1 экзон
		-509C/T	5'UTR
		R25P	1 экзон
TNF α	6p21.3	-308 G/A	5'UTR
		-863 C/A	5'UTR
		-238 G/A	5'UTR

КГМУ.

Биохимические методы. Эритроциты получали из венозной крови традиционным методом Beutler E., et al (1976) с незначительной модификацией. С целью выделения мембран производили гемолиз эритроцитов осмотическим шоком по методу Dodge G.T., et al (1964). Фракционирование мембранных белков осуществляли с помощью одномерного градиентного электрофореза в ПААГ по модифицированному методу Laemmeli U.K. (1970). Идентификация 16 мембранных белков осуществлялась согласно классификации Fairbanks G., et al (1971) с использованием аналитического пакета OncDScan 1.3.

Статистические методы. Формирование базы данных осуществлялось с использованием программы Statistica 5.5. Обработка данных осуществлялась по стандартным методикам вариационной статистики (Урбах В.Ю., 1975). Математические расчеты проводились с помощью пакетов прикладных программ Statistica 5.5, Excel, а также программы GEN1, разработанной д.б.н. Трубниковым В.И. (Трубников В.И., 1980, 1992). Полученные результаты проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова (Урбах В.Ю., 1975; Лакин Г.Ф., 1990). Тестирование распределений генотипов на соответствие равновесию Харди-Вайнберга в выборке и сравнение с частотами аллелей и генотипов разных популяций проводили с помощью критерия χ^2 . Проверка на неравновесие по сцеплению между парами ДНК-маркеров проводилась по Hill W.G., 1974. Оценку связей полиморфизмов генов цитокинов с количественными характеристиками БСМЭ проводили с помощью критериев Стьюдента и Фишера, дискриминантного, кластерного, корреляционного анализов, а также рассчитывая эффекты аллелей и доли дисперсии количественного содержания белков, объясненной изменчивостью по исследуемым локусам (Sing C.F., Davignon J., 1985).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Полиморфизм генов цитокинов в популяциях человека.

Скрининг полиморфизма генов цитокинов среди жителей Курской области и последующий сравнительный анализ с данными, полученными на других выборках, подтвердили наличие специфики распространения аллелей генов цитокинов в разных популяциях и этнических групп. Распределения генотипов в курской популяции не отличались от ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга, о чем свидетельствовало значение $p>0.05$ для частот всех исследуемых полиморфизмов (таблица 2). Низкий уровень аллельного разнообразия был характерен для полиморфизмов T113M *IL-9*, R25P *TGF-β1*, и для всех трех полиморфизмов *TNF-α*: -308G/A, -238G/A, -863C/A. Наблюдаемая гетерозиготность по ним варьировала от 0.047 до 0.268. Однако частоты редких аллелей для этих вариантов в популяции превышали 2%, что свидетельствует в пользу их принадлежности к полиморфизмам, а не мутациям. Максимальное разнообразие по локусам, оцененное по величине фактической гетерозиготности, было характерно для -174G/C *IL-6* (0.532),

Таблица 2.

Распространенность полиморфизмов генов цитокинов среди жителей
Курской области (n=340)

Ген	Полиморфизм	Распределение аллелей		Распределение генотипов (%) [*]			H _o	H _e
		С	Т	СС	СТ	ТТ		
IL1 β	-511C/T	0.694	0.306	49.6	39.6	10.8	0.396	0.425
IL3	S27P	S	P	SS	SP	PP	0.377	0.397
		0.727	0.273	53.8	37.6	8.5		
	-16T/C	T	C	TT	TC	CC	0.379	0.396
IL6	-174G/C	G	C	GG	GC	CC	0.532	0.493
		0.560	0.440	29.4	53.2	17.4		
IL9	T113M	T	M	TT	TM	MM	0.268	0.281
		0.831	0.169	69.7	26.8	3.5		
TGF β	L10P	L	P	LL	LP	PP	0.447	0.479
		0.603	0.397	37.9	44.7	17.4		
	R25P	R	P	RR	RP	PP	0.126	0.128
		0.931	0.069	86.8	12.6	0.6		
	-509C/T	C	T	CC	CT	TT	0.435	0.441
		0.671	0.329	45.3	43.5	11.2		
TNF α	-308G/A	G	A	GG	GA	AA	0.218	0.217
		0.877	0.123	76.8	21.7	1.5		
	-238G/A	G	A	GG	GA	AA	0.047	0.046
		0.977	0.024	95.3	4.7	0.0		
	-863C/A	C	A	CC	CA	AA	0.053	0.052
		0.974	0.027	94.7	5.3	0.0		

Примечание: *-достигнутый уровень значимости для теста на равновесие Харди-Вайнберга $p>0.05$ для частот всех исследованных полиморфизмов; H_o , H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно.

L10P (0.447) и C-509T (0.435) $TGF\beta 1$. Также оно было достаточно значительным для -511C/T $IL-1\beta$ (0.396), S27P (0.377) и -16T/C (0.379) $IL-3$. Для сравнения частот исследованных полиморфизмов, полученных в курской популяции, с данными по другим российским и мировым популяциям из доступной литературы были привлечены результаты генотипирования выборок неродственных здоровых субъектов разных народов, анализ которых свидетельствует в пользу существенных межпопуляционных различий в распространенности исследованных полиморфных вариантов генов цитокинов (рисунок 1). Так, распространенность частого аллеля С полиморфизма -511C/T $IL-1\beta$ у курян была выше, чем у белгородцев и итальянцев, но ниже, чем у финнов. По частоте аллелей Т и Р полиморфизмов -16T/C и S27P $IL-3$ куряне превосходили японцев. По -174G/C $IL-6$ куряне, не отличались от других выборок, в то время как аллель Т по T113M $IL-9$ у них был более распространен, чем у таджиков, менее, чем у бурят и не отличался по распространенности среди русских жителей Томска. Частота аллеля L по полиморфизму L10P $TGF\beta 1$ у курян была ниже, чем у финнов, но выше, чем у итальянцев и не отличалась от таковой у

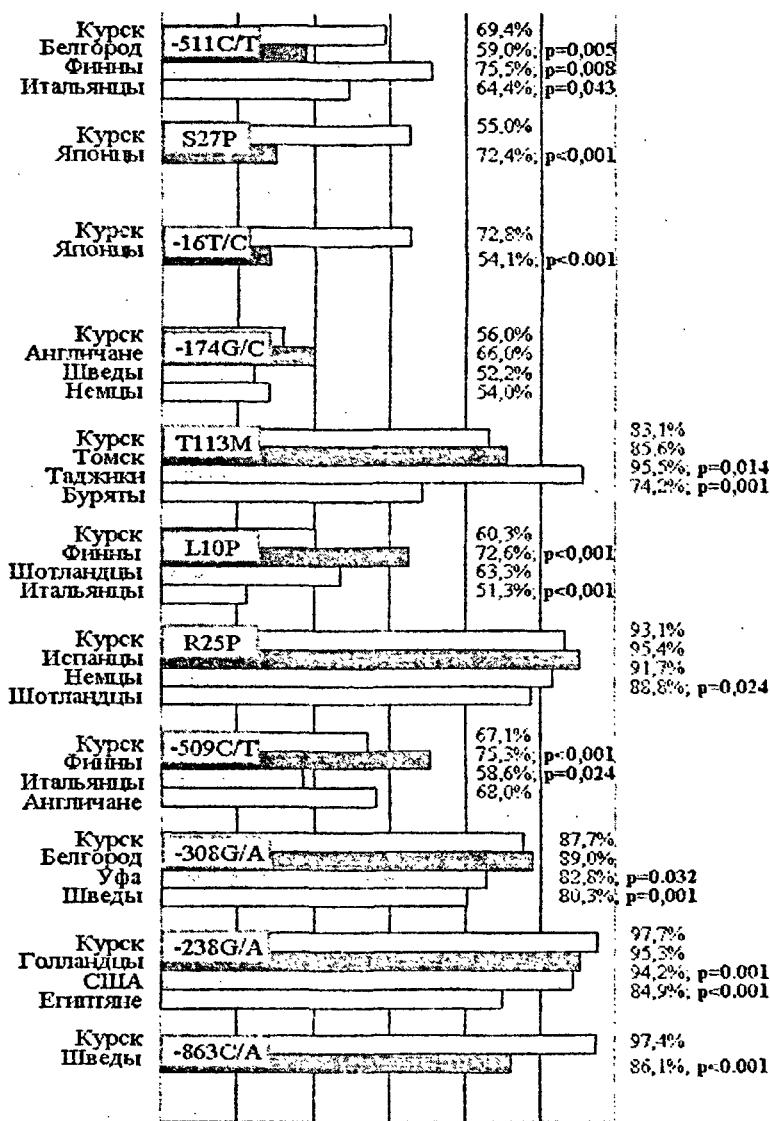


Рисунок 1. Сравнительный анализ частот аллелей полиморфизмов генов цитокинов в популяции Курской области с другими популяциями мира. Приведены значения р для популяций, статистически значимо отличавшихся от курской по частотам соответствующих аллелей.

наследованию L10P и -509C/T *TGFβ1* ($D=0.186$; $\chi^2=222.10$; $p<0.001$), а также наличие полного неравновесия по сцеплению между -16T/C и S27P *IL-3* ($D=0.198$; $\chi^2=337.49$; $p<0.001$), что исключило разделение их эффектов на последующих этапах исследования.

Таким образом, полученные данные продемонстрировали особенности распространенности полиморфных вариантов генов цитокинов в различных популяциях и народах, что указывает на присутствие генетической гетерогенности разных народов по исследованным локусам, и может быть

шотландцев, тогда как аллель R по R25P *TGFβ1* встречался чаще, чем в шотландской выборке, но с той же частотой, что у испанцев и немцев. По частоте аллеля C полиморфизма -509C/T *TGFβ1* куряне уступали финнам, превосходили итальянцев и не отличались статистически значимо от англичан. Распространенность аллеля G по -308G/A *TNFα* в курской популяции была такой же, как и в белгородской но выше, чем у жителей Уфы и шведов, распространенность аллеля G по полиморфизму -238G/A *TNFα* была такой же, как у голландцев, выше, чем у белых американцев и египтян, и частота аллеля C по -863C/A *TNFα* также

была выше, чем у шведов. Проверка полиморфизмов на неравновесие по сцеплению обнаружила существенную тенденцию к совместному

связано с имеющими место межпопуляционными различиями в распространенности многих мультифакториальных заболеваний (МФЗ), в развитии которых существенную роль играет система цитокинов.

2. Белки клеточных мембран эритроцитов у человека.

В результате исследования количественного содержания основных белков было выявлено, что наиболее представленными белками в мембранах являлись АТБ, белок 4.5, α - и β -спектрины (таблица 3). В меньшем количестве присутствовали белки 4.1, 4.2, 4.5.1, 5. Еще меньше 2.1-анкирина, белков 4.9, 7.1, ГАФД, GST. Наименьшим количеством отличались 2.2- и 2.3-спектрины, а также β -тропомиозин. Самым значительным уровнем дисперсии характеризовались спектрины, АТБ и белок 4.5.

Таблица 3

Количественные характеристики белков мембран эритроцитов человека в Курской популяции (N=182), мкг белка/мг мембранны

Мембранные белки	$M \pm m$	δ^2	δ^2/x
α -спектрин	118.13 \pm 2.4	1047.96	8.9
β -спектрин	112.90 \pm 2.4	1021.84	9.1
2.1-анкирин	31.48 \pm 0.9	138.00	4.4
2.2-анкирин	17.88 \pm 0.7	88.29	4.9
2.3-анкирин	13.57 \pm 0.5	48.80	3.6
Белок 3 (АТБ)	194.29 \pm 2.8	1441.04	7.4
Белок 4.1	47.89 \pm 0.9	137.22	2.9
Белок 4.2 (палладин)	57.54 \pm 1.1	219.36	3.8
Белок 4.5.1	56.79 \pm 1.3	324.92	5.7
Белок 4.5 (ГТ)	140.65 \pm 2.6	1247.78	8.9
Белок 4.9 (дематин)	28.23 \pm 0.6	76.69	2.7
Белок 5 (актин)	53.11 \pm 0.8	108.97	2.1
Белок 6 (ГАФД)	37.02 \pm 0.9	136.42	3.7
Белок 7.1 (α -тропомиозин)	25.41 \pm 0.6	73.07	2.9
Белок 7.2 (β -тропомиозин)	18.37 \pm 0.6	74.60	4.1
Белок 8 (GST)	22.99 \pm 0.9	150.52	6.5

Результаты сравнительного анализа количественной представительности и вариабельности основных компонентов белкового спектра мембран эритроцитов (БСМЭ) среди лиц мужского и женского пола не обнаружили статистически значимых различий между рассмотренными белковыми фракциями.

В целях установления особенностей взаимного варьирования количественного содержания основных мембранных белков между собой был проведен корреляционный и кластерный анализ. Их результаты показали, что структуры взаимосвязей между количественными характеристиками мембранных белков в группах мужчин и женщин существенно не отличаются между собой. Проведенный дискриминантный анализ, не выявил статистически значимых различий ($F=1.18$; $p>0.05$).

Отсутствие статистически значимых различий в количественных характеристиках отдельных фракций белков между выборками мужчин и женщин, а также в структуре корреляционных взаимосвязей между белками,

отражающих их интеграцию в пределах клеточной мембраны, позволили в дальнейшем рассматривать выборки мужчин и женщин анализе как единую статистическую совокупность.

3. Полиморфизм генов цитокинов и количественные характеристики мембранных белков эритроцитов

Сравнительный анализ количественного содержания мембранных белков эритроцитов с помощью критерия Стьюдента в группах лиц с различными полиморфными вариантами генов цитокинов позволил выявить статистически значимое изменение количественной представительности 10 мембранных белков в зависимости от 9 полиморфизмов (таблица 4). Так, альтернативные гомозиготы CC и PP по полиморфизму -16 T/C и S27P гена *IL-3* отличались повышенным содержанием β -тропомиозина по сравнению с частыми гомо- и гетерозиготами. Для носителей генотипа CC по -174G/C *IL-6* было характерно повышенное содержание 2.3-анкирина. Обладатели аллеля M по полиморфизму T113M *IL-9* отличались повышенным содержанием обеих фракций спектринов, носители альтернативного аллеля P по R25P *TGF β 1* характеризовались более низкой представительностью β -спектрина и 2.1-анкирина по сравнению с индивидами, у которых этот аллель отсутствовал. Гомозиготы PP по L10P и TT по -509C/T гена *TGF β 1* отличались повышенным содержанием дематина, а носители аллеля A по -308G/A *TNF α* – увеличением представительности белков 4.1 и 4.5.1. Наличие аллеля A по замене -863C/A *TNF α* сопровождалось увеличением содержания белков 6 и 7.1. Также с генетической вариабельностью исследованных локусов были связаны показатели фенотипической дисперсии мембранных белков. Генотипспецифические изменения наблюдались в дисперсиях всех белков, кроме GST.

В связи с тем, что функции плазматических мембран зависят не только от количественной представительности отдельных белковых фракций, но и от характера их взаимного варьирования между собой, нами был проведен многомерный анализ этих взаимосвязей в группах лиц, сформированных по наличию того или иного генотипа по каждому полиморфизму. Кластерный анализ установил, что изменчивость по исследуемым локусам связана с изменением силы и структуры корреляционных взаимосвязей между количественным содержанием белков. Наличие генотипспецифических изменений количественных взаимосвязей белков мембран подтвердил сравнительный анализ матриц фенотипических корреляций количественного содержания мембранных белков с использованием ЛДФ (таблица 5). Из 11 полиморфизмов 10 проявили связь с особенностями взаимного варьирования мембранных белков эритроцитов, исключение составил -863C/A *TNF α* . Это говорит о том, что генетическая вариабельность цитокинов может оказывать влияние на определенные перестройки в белковой структуре эритроцитарных мембран.

Таким образом, полученные данные дают основание полагать, что исследованные нами однонуклеотидные полиморфизмы играют

Таблица 4

Сравнительный анализ количественного содержания основных мембранных белков эритроцитов в зависимости от полиморфизма генов цитокинов

Мембранные белки, M±m	Полиморфизмы, генотипы			Группы сравнений, значение t-критерия		
Белок 7.2	S27P <i>II.3</i>			SS-SP	SP-PP	SS-PP
	SS (n=99)	SP (n=65)	PP (n=18)			
	18.47±0.87	17±0.88	23.58±2.82		1.14	2.23*
Белок 7.2	-16T/C <i>II.3</i>			TT-TC	TC-CC	TT-CC
	TT (n=99)	TC (n=66)	CC (n=17)			
	18.47±0.87	16.93±0.87	24.26±2.90		1.20	2.42*
2.3-анкирин	-174G/C <i>II.6</i>			GG-GC	GC-CC	GG-CC
	GG (n=53)	GC (n=96)	CC (n=33)			
	13.03±0.86	12.76±0.64	16.51±1.62		1.14	2.23*
α-спектрин	T113M <i>II.9</i>			TT-(TM+MM))	2.15*	2.17*
	TT (n=124)	TM (n=50)+MM (n=8)				
	109.37±3.01	120.48±3.99				
β-спектрин	108.98±2.94	120.17±3.89			2.22*	
Белок 4.9	L10P <i>TGFβ1</i>			LL-LP	LP-PP	LL-PP
	LL (n=71)	LP (n=76)	PP (n=35)			
	28.38±1.09	26.56±0.90	30.95±1.56		1.29	2.59*
β-спектрин	R25P <i>TGFβ1</i>			RR-RP	1.99*	2.00*
	RR (n=157)	RP (n=25)				
	114.36±2.52	101.18±2.52				
2.1-анкирин	31.99±0.93	27.1±0.93			2.00*	
Белок 4.9	-509C/T <i>TGFβ1</i>			CC-CT	CT-TT	CC-TT
	CC (n=82)	CT (n=77)	TT (n=23)			
	27.68±0.98	26.99±0.91	33.44±1.98		0.51	3.24*
Белок 4.1	-308G/A <i>TNFα</i>			GG-(GA+AA)	2.17*	2.07*
	GG (n=137)	GA (n=41)+AA (n=4)				
	47.35±0.98	62.37±1.89				
Белок 4.5.1	55.37±1.49	61.75±2.86			2.07*	
Белок 6	-863C/A <i>TNFα</i>			CC-CA	2.88*	2.91*
	CC (n=173)	CA (n=9)				
	36.56±0.88	47.89±3.42				
Белок 7.1	25.08±0.62	33.44±4.03			2.91*	

Примечание: * - p<0.05

определенную роль в формировании характерной структуры мембраны и могут отражаться на ее свойствах. Фенотипически это проявляется в статистически значимом изменении количественного содержания и

Таблица 5

Величина F-отношения, полученного при сравнении матриц фенотипических корреляций белков эритроцитов в группах лиц с различными генотипами по исследуемым полиморфизмам

Ген	Полиморфизм	Сравниваемые группы		
		CC-CT	CT-TT	CC-TT
IL1 β	-511C/T	CC-CT	CT-TT	CC-TT
	F-отношение	1,42	4,02*	3,98*
IL3	-16 T/C	TT-TC	TC-CC	CC-TT
	F-отношение	2,67*	6,64*	4,69*
	S27P	SS-SP	SP-PP	SS-PP
IL6	F-отношение	2,63*	6,72*	4,69*
	-174G/C	GG-GC	GC-CC	GG-CC
IL9	F-отношение	2,37*	4,60*	1,50
	T113M	TT-(TM+MM)	—	—
	F-отношение	2,21*	—	—
TGF β 1	L10P	LL-LP	LP-PP	LL-PP
	F-отношение	1,67	3,54*	4,01*
	R25P	RR-RP	—	—
	F-отношение	2,92*	—	—
	-509C/T	CC-CT	CT-TT	CC-TT
	F-отношение	1,41	4,39*	4,80*
TNF α	-308G/A	GG-[GA+AA]	—	—
	F-отношение	3,39*	—	—
	-238G/A	GG-GA	—	—
	F-отношение	1,14	—	—
	-863C/A	CC-CA	—	—
	F-отношение	2,61*	—	—

Примечание: * - $p < 0.05$

дисперсии ее основных белковых фракций, а также в особенностях их взаимного варьирования, которые, возможно, отражают определенные изменения архитектоники эритроцитарных мембран.

4. Вклад генетического полиморфизма в количественную вариабельность белков эритроцитарных мембран

Исследование комплексной роли полиморфизма генов цитокинов в определении изменчивости количественного содержания белков мембран эритроцитов также оценивали, определяя эффекты влияния отдельных аллелей на содержание белков (отклонение количественного содержания белка от среднего в популяции значения, связанное с носительством того или иного аллеля) и долю фенотипической дисперсии их количественного содержания, обусловленную генетической изменчивостью отдельных геновых локусов цитокинов и их совокупности по алгоритму, предложенному Sing и Davignon (Sing C.F., Davignon J., 1985).

Расчет эффектов аллелей показал, что практически все исследованные полиморфизмы в той или иной степени влияют на варьирование количественного содержания изученных белков, что отражает роль

цитокинов в осуществлении контроля над формированием количественной представительности БСМЭ. Для большей части изученных полиморфизмов наиболее существенные эффекты аллелей прослеживались в отношении АТБ и β -спектрина.

Результаты расчета доли общей фенотипической изменчивости количественного содержания мембранных белков эритроцитов полиморфизма генов цитокинов, объясненной различиями генотипов по отдельным исследуемым локусам, показали, что вклад полиморфизмов в формирование общей фенотипической вариансы варьировал в пределах от отсутствия эффекта (R25P $TGF\beta 1$ по актину и β -тропомиозину, -238G/A $TNF\alpha$ по β -тропомизину и -863C/A $TNF\alpha$ по 2.1- и 2.3-анкиринам и дематину) до 15,3% (-308G/A $TNF\alpha$ по АТБ). Величина вклада более 10% была характерна для дисперсии β -спектрина по полиморфизмам T113M $IL-9$ и -238G/A $TNF\alpha$, а также для АТБ по -511C/T $IL-1\beta$ и -863C/A $TNF\alpha$. Таким образом, вклад отдельных полиморфизмов в формирование количественной вариабельности мембранных белков эритроцитов был достаточно выраженным.

Доля суммарного вклада генетического полиморфизма совокупности исследованных локусов в формирование общей фенотипической дисперсии количественного содержания белковых фракций мембран эритроцитов оценивалась как средневзвешенное значение соответствующих величин вкладов отдельных полиморфизмов. Минимальное значение фенотипической дисперсии, связанной совокупностью вариабельности генов цитокинов, было характерно для 2.3-анкирина (0,45%), максимальное значение отмечено для АТБ (6,91%) (таблица 6). Оценку доли генетически обусловленной дисперсии мембранных белков эритроцитов, сформированной совокупностью исследованных полиморфизмов, рассчитывали как процентное отношение усредненной величины доли общей фенотипической дисперсии, к коэффициентам наследуемости, приведенным в таблице 6. Наибольшая доля генетически обусловленной дисперсии была сформирована совокупностью полиморфизмов у β -спектрина ($G_{pg}=12,30\%$), α -спектрина ($G_{pg}=11,12$), АТБ ($G_{pg}=9,69$). Минимальные величины вклада отмечены для 2.2- и 2.3-анкиринов ($G_{pg}=0,77\%$ и $G_{pg}=0,81\%$, соответственно) и для актина ($G_{pg}=0,94\%$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что исследованные полиморфизмы генов цитокинов влияют на количественную вариабельность компонентов БСМЭ, что в свою очередь может отражаться на свойствах клеточных мембран. По-видимому, в основе обнаруженных фактов лежат функциональные свойства генов цитокинов, являющихся важными гемопоэтическими, способными регулировать экспрессию генов мембранных белков, чьи фенотипические эффекты сохраняются у эритроцитов, вышедших в кровяное русло.

Таблица 6

Доля общей фенотипической и генетически обусловленной дисперсий количественного содержания мембранных белков (в %), обусловленная разнообразием по совокупности исследованных локусов

Компоненты дисперсии	Мембранные белки							
	α -сп	β -сп	2.1	2.2	2.3	3	4.1	4.2
G	5,16	6,27	1,08	0,52	0,45	6,61	0,91	1,31
A	3,92	4,20	0,67	0,41	0,26	5,21	0,42	0,75
D	1,24	2.07	0,41	0,08	0,19	1,40	0,49	0,56
G_{pg}	11,12	12,30	1,82	0,77	0,81	9,69	1,54	1,79
$H^2, \%$	45,12	53,22	59,55	67,26	55,68	68,22	59,01	73,12
Компоненты дисперсии	Мембранные белки							
	4.5.1	4.5	4.9	5	6	7.1	7.2	8
G	2,50	4,73	1,05	0,65	1,11	0,79	1,41	0,85
A	1,77	3,11	0,31	0,30	0,68	0,58	0,52	0,58
D	0,83	1,62	0,74	0,35	0,43	0,21	0,89	0,27
G_{pg}	4,26	6,21	1,94	0,94	2,02	1,27	2,87	1,38
$H^2, \%$	58,70	50,11	54,04	69,22	54,82	62,24	49,13	61,41

Примечание. G – доля общей фенотипической дисперсии, объясняемая генотипическими различиями по совокупности локусов; A, D – аддитивная и доминантная компоненты G соответственно; h^2 – коэффициент наследуемости количественного содержания мембранных белков; G_{pg} – вклад генотипической варianсы совокупности исследуемых локусов в генетически обусловленную дисперсию признака.

ВЫВОДЫ

1. Исследованные 11 полиморфных вариантов 6 генов цитокинов среди жителей Курской области характеризуются широкой вариабельностью популяционных частот от 2,4% (аллель A по полиморфизму -238G/A) до 44% (аллель C по полиморфизму -174G/C). При этом частоты 10 полиморфизмов (кроме -174G/C) статистически значимо отличались от частот соответствующих аллелей в ряде других популяций.

2. Полученные в настоящем исследовании данные о количественной представительности основных мембранных белков эритроцитов и их корреляционных взаимосвязях между собой согласуются с данными ранее опубликованных исследований и свидетельствуют о приоритетной представленности анионтранспортного белка, белка 4.5, α - и β -спектринов.

3. Белковые фракции мембран эритроцитов у человека характеризуются выраженной фенотипической изменчивостью, при этом ее величина была наиболее высокой для α - и β -спектринов, анионтранспортного белка, белка 4.5.

4. Количественное содержание основных мембранных белков человека в норме находится под выраженным генетическим контролем. Наименьшая генетическая детерминированность количественного содержания была установлена для α -спектрина (0,45), наибольшая – для паллидина (0,73).

5. Полиморфизм генов цитокинов оказывает влияние на формирование фенотипических дисперсий исследованных мембранных белков и их количественного содержания по 10 белковым фракциям, а также способствует изменениям характера корреляционных взаимосвязей между отдельными белковыми фракциями в пределах клеточных мембран.

6. Доля вклада совокупности полиморфизмов генов цитокинов в формирование фенотипических дисперсий количественного содержания белковых фракций мембран эритроцитов варьировала от 0,45% (для 2.3-анкирина) до 6,91% (для анионтранспортного белка). Величина вклада изученных локусов в полигенно обусловленную дисперсию количественного содержания мембранных белков составляла от 0,77% для 2.2-анкирина и до 12,3% у β -спектрина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТБ – анионтранспортный белок

БСМЭ – белковый спектр мембран эритроцитов

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GST – глутатион-S-трансфераза

ГТ – глюкозный транспортер

МФЗ – мультифакториальные заболевания

ПААГ – полиакриламидный гель

IL – интерлейкин (interleukin)

TGF – трансформирующий фактор роста (transforming growth factor)

TNF – фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor)

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Иванов, В.П. Частота мутации Leu10Pro гена трансформирующего фактора роста β 1 в курской популяции / В.П. Иванов, А.В. Полонников, Д.А. Белугин // Естествознание и гуманизм: сб. науч. работ. – Томск, 2004. - Т.1, № 2. - С. 6.

2. Иванов, В.П. Регуляторные эффекты цитокинов в процессе созревания и дифференцировки эритроцитов / В.П. Иванов, Д.А. Белугин // Университетская наука: взгляд в будущее: сб. тр. юбил. науч. конф. КГМУ и сес. Центр.-Чернозем. науч. центра РАМН, посвящ. 70-летию КГМУ. – Т.1. - Курск: Курский гос мед ун-т, 2005. - С. 172-173.

3. Лемешко, С.С. Актуальность изучения вклада генетического полиморфизма цитокинов в формирование белкового скелета клеточных мембран эритроцитов / С.С. Лемешко, Д.А. Белугин // Молодежная наука и современность: юбил. межвузов. науч. конф. студентов и молодых ученых, посвящ. 70-летию КГМУ. - Курск: Курский гос мед ун-т, 2005.- С. 64-65.

4. Белугин, Д.А. Анализ частоты полиморфизма $\text{Arg}^{25} \rightarrow \text{Pro}$ гена $\text{TGF}\beta 1$ среди жителей Центрально-Черноземного района Российской Федерации / Д.А. Белугин, А.В. Полоников // Сб. работ XII междунар. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005». – М.: МГУ, 2005. - С. 419-420.
5. Частота однонуклеотидного полиморфизма -511C/T в промоторной области гена IL-1 β среди жителей Курской области и перспективы ее изучения при мультифакториальных заболеваниях / Д.А. Белугин, В.П. Иванов, А.В. Полоников, М.А. Солодилова // Мед. генетика. – 2005. - №4. - С. 157-158.
6. Структурно-функциональная организация клеточных мембран и ее изменения при мультифакториальных заболеваниях / В.П. Иванов, А.В. Полоников, М.А. Солодилова и др. // Инновационные методы в образовании, науке и медицине: сб. науч. тр. – Курск, 2005. - С. 40 – 44.
7. Иванов, В.П. К вопросу о регуляции пролиферации и дифференцировки клеток эритроидного ряда / В.П. Иванов, Д.А. Белугин, А.В. Полоников // Материалы IV междунар. науч.-практ. конф. «Динамика научных достижений – 2005». - Т.1.Биология. – Днепропетровск, 2005 -С. 18-21.
8. Модифицирующий эффект полиморфизма -511C/T гена IL1 β на количественную вариабельность белков цитоскелета эритроцитов / В.П. Иванов, Д.А. Белугин, А.В. Полоников и др. // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 80.
9. Association of a promoter -511 C/T polymorphism of the interleukin-1 β gene with susceptibility to duodenal ulcer disease in Russians of Central-Chernozem region of Russia / V.P. Ivanov, A.V. Polonikov, D.A. Belugin et al. // HGVS scientific meeting (Kyoto (Japan), April 2005). - Kyoto, 2005. - Р. 124. – ABSTRACT
- 10.Белугин, Д.А. Популяционная распространенность полиморфизма -174G/C гена IL6 среди жителей курской области / Д.А. Белугин, В.П. Иванов, А.В. Полоников // Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии: материалы рос. науч. конф. с междунар. участием. В 2-х т. – Т. 1. – Курск: КГМУ, 2006. – С. 15-18
- 11.Белугин, Д.А. Влияние трансформирующего фактора роста в на некоторые физиологические процессы в норме и при патологии / Д.А. Белугин, В.П. Иванов, А.В. Полоников // Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии: материалы рос. науч. конф. с междунар. участием. В 2-х т. – Т. 1. – Курск: Курский гос. мед. ун-т, 2006. – С. 241-245.
- 12.Вклад полиморфизма $\text{Leu}^{10} \rightarrow \text{Pro}$ гена $\text{TGF}\beta 1$ в количественную вариабельность мембранных белков эритроцитов человека / Д.А. Белугин, В.П. Иванов, А.В. Полоников, И.В. Хорошая // Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии: материалы рос. науч. конф. с междунар. участием. В 2-х т. – Т. 1. – Курск: Курский гос. мед. ун-т, 2006. – С. 422-425.

13. Влияние полиморфизма генов цитокинов на фенотипическую вариабельность количественного содержания цитоскелетных белков эритроцитов человека / Д.А. Белугин, В.П. Иванов, А.В. Полоников, И.В. Хорошая // Интеграция медицины и образования: сб. материалов науч. конф. – Курск: Изд-во КГУ, 2006. – С. 6-9.

14. Белугин, Д.А. Распространенность мажорного полиморфизма -509С/Т в 5'-фланкирующем регионе гена TGF β 1 среди жителей Центрально-Черноземного района / Д.А. Белугин, В.П. Иванов, А.В. Полоников // Университетская наука: взглян в будущее: сб. тр. 71-й науч. конф. КГМУ и сес. Центр.-Чернозем. науч. центра РАМН. В 2-х т. – Курск: Курский гос. мед. ун-т, 2006. – Т.1. – С. 144 – 145.

15. Белугин, Д.А. Анализ ассоциации генетического полиморфизма интерлейкина-1 β с количественной вариабельностью мембранных белков эритроцитов / Д.А. Белугин // Молодежная наука и современность: 71-я итог. межвузов. конф. студентов и молодых ученых. – Курск: Курский гос. мед. ун-т, 2006. – Ч. 1. – С. 52.

16. Белугин, Д.А. Влияние полиморфных вариантов гена TGF β 1 на количественную вариабельность белков цитоскелета эритроцитов / Д.А. Белугин // Молодежная наука и современность: 71-я итог. межвузов. конф. студентов и молодых ученых. – Курск: Курский гос. мед. ун-т, 2006. – Ч. 1. – С. 53.

17. Шибаев, П.В. Полиморфизм гена фактора некроза опухоли α : популяционная распространенность / П.В. Шибаев, Д.А. Белугин // Молодежная наука и современность: 71-я итог. межвузов. конф. студентов и молодых ученых. – Курск: Курский гос. мед. ун-т, 2006. – Ч. 1. – С. 86.

18. Влияние генетического полиморфизма интерлейкина 6 на количественную представительность мембранных белков эритроцитов / Д.А. Белугин, В.П. Иванов, А.В. Полоников, И.В. Хорошая // V Всероссийская университетская научно-практическая конф. молодых ученых и студентов по медицине: Сб. материалов. – Тула, 2006. – С. 31 – 32.

19. Analysis of common transforming growth factor beta-1 gene polymorphisms in gastric and duodenal ulcer disease: Pilot study / A.V. Polonikov, V.P. Ivanov, D.A. Belugin et al. // Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2006. – doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04542.x.

Белугин Дмитрий Александрович (Россия)

Полиморфизм генов цитокинов и его вклад в вариабельность количественного содержания мембранных белков эритроцитов человека

Исследована популяционная распространенность 11 полиморфизмов 6 генов цитокинов (у 340 чел.) и определено количественное содержание 16 основных мембранных белков эритроцитов (у 182 чел) в группе неродственных здоровых индивидов русской национальности, постоянно проживающих на территории Курской области. Отмечена специфика распространенности исследованных полиморфизмов в курской популяции по сравнению с другими российским и мировыми популяциями и этническим группами. Выявлена связь данных полиморфных вариантов с изменением количественного содержания 10 и фенотипической вариабельности 15 мембранных белков эритроцитов. Обнаружена специфика взаимного варьирования мембранных белков эритроцитов у носителей различных полиморфных вариантов, отражающая возможные перестройки архитектоники эритроцитарной мембраны в зависимости от комбинации аллелей цитокинов. Определена доля вклада изученных полиморфизмов в формирование общей фенотипической и полигенно-обусловленной дисперсии количественного содержания мембранных белков эритроцитов. Полученные данные свидетельствуют о влиянии полиморфизмов генов цитокинов на количественные характеристики эритроцитарных мембран.

Belugin Dmitriy Aleksandrovich (Russia)

Polymorphism of cytokine genes and its contribution to the quantitative variability of erythrocyte membrane proteins in human

Frequency of 11 polymorphisms of 6 cytokine genes (in 340 individuals) and quantitative variability of 16 basic erythrocyte membrane proteins (in 182 individuals) in unrelated healthy Russian individuals of Kursk region has been investigated by author. This data reveals specific features of investigated polymorphism frequency in Kursk population in comparison with other Russian and foreign populations and ethnic groups. Correlation between these SNP and quantitative changes of 10 erythrocyte membrane proteins and phenotypic variability of 15 proteins has been revealed. The author shows specific intervariation of erythrocyte membrane proteins depending on the different polymorphic variants. This proves that special features of erythrocyte membrane cytoskeleton depend on the cytokine alleles combination. The percentage of polymorphisms contribution into the total phenotypical and polygenic dispersion of erythrocyte membrane proteins quantitative variability has been investigated. These data elucidated the connection between cytokine genes polymorphism and quantitative variability of erythrocyte membrane proteins.

Отпечатано в ООО «Оргсервис—2000»
Подписано в печать 05.10.06 Объем 1,25 п.л.
Формат 60x90/16. Тираж 100 экз. Заказ № 27/09—1т
115419, Москва, Орджоникидзе, 3