

УДК 616.24-006.6-02:577.2

МНОГОМЕРНЫЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

¹Храмцов А.В., ¹Иванов В.П., ¹Трубникова Е.В., ¹Стабровская Н.В.,
²Бачинский О.Н., ¹Кохтенко Е.В.

¹Курский государственный университет, НИЛ «Генетика», Курск, e-mail: kurskgu@kursk-uni.ru;

²Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Курская городская больница №6»,
Курск, e-mail: gb6kursk@yandex.ru

В работе представлены результаты изучения основных показателей функциональной активности рибосомных генов, а именно: функциональной активности по 10 хромосомам, по хромосомам групп D и G, числу ассоциаций хромосом, количеству хромосом в ассоциациях и количеству активных рибосомных цистронов. Данные показатели были исследованы у лиц, больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), в сравнении с группой контроля. Установлено, что функциональная активность рибосомных генов по таким показателям, как число ассоциаций хромосом, ассоциативный индекс и активность по 10 хромосомам, была завышена в группе больных ХОБЛ, в сравнении с контрольной группой. В исследовании приводится многообразие методов многомерного анализа данных с целью выявления наиболее ценных прогностических показателей, вовлеченных в патогенез хронической болезни легких.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, функциональная активность рибосомных генов, корреляции

MULTIVARIABLE ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF RIBOSOMAL GENES IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

¹Khramtsov A.V., ¹Ivanov V.P., ¹Trubnikova E.V., ¹Stabrovskaya N.V.,
²Bachiński O.N., ¹Kokhtenko E.V.

¹Kursk State University, Research laboratory of «Genetics», Kursk, e-mail: kurskgu@kursk-uni.ru;

²Oblasnoe budgetary institution of health «Kursk City Hospital № 6»,
Kursk, e-mail: gb6kursk@yandex.ru

This work shows the results of studying the main indicators of functional activity of ribosomal genes such as the functional activity of 10 chromosomes, chromosomes in groups D and G, the number of associations of chromosomes, the number of chromosomes in associations and the number of active ribosomal cistrons. These indicators were studied among people with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in comparison with the control group. The functional activity of ribosomal genes in such indicator are the number of chromosomes, associative index and active 10 chromosomes is less in COPD patients group than in the control group. In the investigation there is a variety of methods of multivariable dates for analysis purpose of which to show the most valuable prognostic indicators involved in the pathogenesis of chronic lung disease.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, functional activity of ribosomal genes, correlations

В современном обществе хроническая обструктивная болезнь легких, наряду с артериальной гипертонией, ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом, входит в группу ведущих хронических заболеваний; на их долю приходится более 30% среди всех других форм патологии человека. Всемирная организации здравоохранения (ВОЗ) относит ХОБЛ к заболеваниям с высоким уровнем социального бремени, широко распространенным как в развитых, так и в развивающихся странах. По прогнозу на период до 2020 г., составленному экспертами ВОЗ, ХОБЛ станет не только одной из самых распространенных болезней человека, но войдет в число лидирующих причин смертельных исходов. В то же время ожидается снижение уровня летальности от

инфаркта миокарда, онкологических заболеваний, туберкулеза и т.д. [5].

Согласно рекомендациям Американского торакального общества и Европейского респираторного общества ХОБЛ определяется как заболевание, которое можно предупредить и лечить, характеризующееся не полностью обратимой бронхиальной обструкцией. Ограничение воздушного потока обычно прогрессирует и связано с абнормальным воспалительным ответом дыхательных путей на повреждающие частицы или газы, причем основной причиной которого является курение. Хотя ХОБЛ поражает легкие, она также приводит к значимым системным проявлениям [1].

Важной особенностью условий возникновения ХОБЛ у конкретного индивидуума

является длительное (исчисляемое порой десятилетиями) действие этиологических факторов (факторов риска). К внешним факторам риска относятся табакокурение, социально-экономический статус, профессия, загрязнение окружающей среды, рецидивирующая бронхолегочная инфекция, перинатальная патология и детские болезни, питание. К внутренним факторам относятся генетическая предрасположенность, пол, бронхиальная гиперреактивность, гипериммуноглобулинемия E, бронхиальная астма. При этом обычно совместное действие и внутренних, и внешних факторов формирует заболевание [2, 6].

Хроническая обструкция легких, как и любое мультифакториальное заболевание, характеризуется не только разнообразием этиологических факторов, но и рядом патогенных показателей, составляющих ее основу. Со стороны функционирования рибосомального аппарата клетки, данная патология мало изучена. Рибосомные гены содержат наследственную информацию о рибосомах, которые, в свою очередь, обеспечивают синтез белка. Интенсивность синтеза белка влияет на пролиферацию клеток, которая, в свою очередь, определяет скорость роста тканей. Геномная доза рибосомных генов определяет потенциальные возможности общей интенсивности синтеза белков в клетке [3]. Недостаточность изучения вовлеченности вышеперечисленных факторов в патогенез ХОБЛ определило проведение настоящего исследования.

Целью нашего исследования являлось изучение основных показателей функциональной активности рибосомных генов (ФАРГ), а также характер их взаимосвязей при хронической обструктивной болезни легких.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили лимфоциты 186 лиц, страдающих хронической обструкцией легких в возрасте от 50 до 70 лет и контрольной группы в числе 53 практически здоровых лиц, жителей города Курска и Курской области. Средний возраст лиц, страдающих ХОБЛ, составил $63,25 \pm 3,21$. Среди обследованных женщины составили 42,11%, мужчины 57,89%.

Метафазные пластики получали путем культивирования лимфоцитов периферической крови по стандартной методике [4]. Фиксацию проводили на 72 часу культивирования, после чего окрашивали раствором нитрата серебра. Активность рибосомных генов оценивали визуально полуколичественным способом и выражали в условных единицах (усл. ед.).

Активность рибосомных генов определяли по интенсивности окраски серебром ядрышкообразующих районов индивидуальных акроцентрических хромосом (13–15 D и 21, 22 G). Для каждого индивидуума анализировали 20 метафазных пластинок. Визуальная

оценка этого показателя производилась по 5-балльной системе, согласно критериям, предложенным в лаборатории общей цитогенетики РАМН: «0» баллов – окраска отсутствует; 1 балл – окраска слабая (зерно серебра много меньше ширины хроматиды); 2 балла – средняя окраска (зерно серебра примерно соответствует ширине хроматиды); 3 балла – интенсивная окраска (зерна серебра больше ширины хроматиды); 4 балла – высокоинтенсивная окраска (зерна серебра, выпавшие на каждой хроматиде, значительно шире ее и слипаются, вместе образуя общий конгломерат). Также отдельно оценивалась активность рибосомных генов, расположенных в хромосомах группы D и группы G. Число активных рибосомных цистронов (RC) определяли по количеству окрашенных хромосом. Подсчитывали число ассоциаций акроцентрических хромосом на одну клетку и число хромосом, вступивших в ассоциации.

Для выбора методов статистического анализа проводилась проверка на нормальность распределения признака. Для этого использовали критерий Шапиро-Уилка, при $p < 0,05$. Так как в большинстве случаев значение p было больше критического, то при описании количественных признаков использовали параметры распределения, отличного от нормального: среднее значение, стандартную ошибку среднего значения, минимальное и максимальное значение признака, медиану, интервал варьирования признаков. Для оценки сложного взаимодействия характеристик проводили расчет коэффициентов корреляций по Спирману (r), являющиеся мерой линейной связи признаков, а также линейно-дискриминантной функции (ЛДФ).

Результаты исследования и их обсуждение

Основные показатели комплекса функциональной активности рибосомных генов у больных с ХОБЛ и контрольной группы представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

Средний показатель суммарной функциональной активности рибосомных генов по 10 хромосомам у больных с ХОБЛ составил $19,49 \pm 2,00$ у.е. (95% CI 19,20–19,78 у.е.), варьировался от 15,28 до 24,84 у.е. Значение медианы (Me = 19,45 у.е.) практически совпадало со средним значением и находилось посередине межквартильного интервала ($Q_{25} = 18$ у.е., $Q_{75} = 20,80$ у.е.). При сравнении с медианным показателем контрольной выборки статистически значимых различий не обнаружено, хотя значение p было очень близко к критическому уровню ($Z = 1,78$, $p = 0,08$). При анализе характера распределения признака также наблюдалась относительная гомогенность ($p = 0,07$).

Показатель активности рибосомных генов по хромосомам группы D у больных с ХОБЛ был равен $11,62 \pm 1,66$ у.е. (95% CI 11,34–11,91 у.е.), варьировался от 6,90 до 16,20 у.е. и почти совпадал с медианным значением (Me = 11,69 у.е.). Статистически значимых отклонений от популяционных характеристик ни при сравнении медиан ($Z = 0,62$, $p = 0,54$), ни при анализе дис-

персии ($p = 0,77$) выявлено не было. Также их не было и при сравнительном анализе функциональной активности рибосомных генов по хромосомам группы G, средний показатель которой составил $7,84 \pm 1,55$ у.е. (95% CI 7,58–8,11 у.е.) и был ниже значе-

ния медианы ($Me = 7,95$ у.е.). Медиана занимала срединное положение относительно квартильных значений ($Q_{25} = 7,00$ у.е., $Q_{75} = 8,80$ у.е.). Критерий Манна–Уитни составил $Z = 1,52$, при $p = 0,13$ и при сравнении дисперсии $p = 0,20$.

Таблица 1

Основные показатели ФАРГ при ХОБЛ

Признак	Mean ± Std.dev.	CI –95–95%	Min	Max	Q25	Me	Q75
10 Ag	19,49 ± 2,00	19,20–19,78	15,28	24,84	18,00	19,45	20,80
D	11,62 ± 1,66	11,34–11,91	6,90	16,20	10,67	11,69	12,65
G	7,84 ± 1,55	7,58–8,11	2,50	11,50	7,00	7,95	8,80
RC	8,76 ± 0,64	8,65–8,87	6,90	10,00	8,30	8,80	9,20
AsCr	0,90 ± 0,34	0,84–0,95	0,00	1,70	0,67	0,90*	1,08
CrAs	2,66 ± 0,64	2,55–2,77	0,00	4,50	2,20	2,67	3,00
AssInd	68,68 ± 21,32	65,06–72,29	0,00	100,00	55,00	70,00*	80,00

Примечания: * $p < 0,05$, 10Ag-суммарная ФАРГ по 10 хромосом; D – показатель ФАРГ по D-хромосомам; G – показатель ФАРГ по G-хромосомам; RC – количество рибосомных цистронов; AsCr – количество ассоциаций хромосом; CrAs – количество хромосом в ассоциациях; AssInd – ассоциативный индекс.

Таблица 2

Основные показатели ФАРГ контрольной группы

Признак, группа	Mean ± Std.dev.	CI –95–95%	Min	Max	Q25	Me	Q75
10 Ag*	19,15 ± 1,91	18,92–19,39	14,85	25,90	17,75	19,00	20,55
D*	11,58 ± 1,41	11,40–11,75	8,40	15,90	10,45	11,45	12,45
G	7,64 ± 1,44	7,46–7,82	4,10	10,80	6,80	7,50	8,85
RC	8,69 ± 0,69	8,60–8,78	6,50	10,00	8,25	8,70	9,20
AsCr*	0,67 ± 0,30	0,63–0,71	0,00	1,60	0,50	0,65	0,85
CrAs*	2,51 ± 0,75	2,39–2,64	0,00	4,00	2,00	2,60	3,00
AssInd*	53,24 ± 23,41	49,31–57,16	0,00	100,0	40,00	50,00	70,00

Примечания: * $p < 0,05$, 10Ag-суммарная ФАРГ по 10 хромосом; D – показатель ФАРГ по D-хромосомам; G – показатель ФАРГ по G-хромосомам; RC – количество рибосомных цистронов; AsCr – количество ассоциаций хромосом; CrAs – количество хромосом в ассоциациях; AssInd – ассоциативный индекс.

Средний показатель количества активных рибосомных цистронов у больных с ХОБЛ составлял $8,76 \pm 0,64$ (95% CI 8,65–8,87), незначительно отклонялся от медианного показателя ($Me = 8,60$) и не отличался от количества активных рибосомных цистронов в контрольной выборке ($Z = 1,13$, при $p = 0,26$). Также относительно данных контроля у больных не были смещены ни границы нижнего и верхнего квартилей, ни значение минимального показателя ($p = 0,33$).

Усреднённое количество ассоциаций акроцентрических хромосом у больных с ХОБЛ составило $0,90 \pm 0,34$ (95% CI 0,84–0,95) на клетку, варьировалось от полного отсутствия до 1,70. Значение медианы ($Me = 0,90$) совпадало со средним значением и практически не отклонялось ни к одному

из квартилей ($Q_{25} = 0,67$ и $Q_{75} = 1,08$). При сравнении с контрольной выборкой установлены статистически значимые различия как для медианных значений ($Z = 6,40$, при $p = 0,0001$), так и для характеристик дисперсии ($p = 0,0001$).

Ассоциативный индекс хромосом в клетках больных с ХОБЛ был равен $68,68 \pm 21,32$ (95% CI 65,06–72,29%), медиана ($Me = 70$ %) была смещена в большую от среднего значения сторону ($Q_{25} = 55$ и $Q_{75} = 80$), а результаты сравнения с контрольной выборкой повторяли таковые по данным количества ассоциаций акроцентрических хромосом: медианный показатель был больше у больных с ХОБЛ ($Z = 5,36$, при $p = 0,0001$), также отличались и границы варьирования ($p = 0,0004$).

Среднее количество ассоциирующих хромосом на клетку составляло $2,66 \pm 0,64$ (95% CI 2,55-2,77), совпадало с медианным значением ($Me = 2,67$) и варьировалось от 0 до 4,5 взаимодействующих хромосом. Сравнительный с контрольной выборкой анализ распределения количества хромосом в ассоциациях показал наличие различий между группами, но принятого для исследования статистически значимого уровня они не достигают

($p = 0,08$). Также статистически значимых различий не выявлено и при сравнении медиан двух групп ($Z = 1,33$, при $p = 0,19$).

Многомерный анализ показателей комплекса функциональной активности рибосомных генов у больных с ХОБЛ и контрольной группы позволил получить значения парных коэффициентов корреляции и установить следующие статистические взаимосвязи (табл. 3 и 4).

Таблица 3

Статистически значимые коэффициенты корреляций в группе больных ХОБЛ

	age R	10 Ag	D	G	RC	AsCr	CrAs	AssInd
age R	1,00							
10 Ag	-0,11	1,00						
D	-0,18*	0,62*	1,00					
G	0,01	0,54*	-0,32*	1,00				
RC	-0,04	0,58*	0,38*	0,30*	1,00			
AsCr	-0,10	0,26*	0,17*	0,13	0,23*	1,00		
CrAs	-0,11	0,13	0,03	0,13	0,17	0,56*	1,00	
AssInd	-0,08	0,19*	0,08	0,15	0,12	0,81*	0,35*	1,00

Примечание. * $p < 0,05$.

Таблица 4

Статистически значимые коэффициенты корреляций в группе контроля

	age R	10 Ag	D	G	RC	AsCr	CrAs	AssInd
age R	1,00							
10 Ag	0,02	1,00						
D	-0,05	0,65*	1,00					
G	0,06	0,67*	-0,12	1,00				
RC	-0,26*	0,53*	0,34*	0,35*	1,00			
AsCr	0,22*	0,13	0,07	0,10	0,01	1,00		
CrAs	0,14	-0,02	-0,03	0,00	-0,20*	0,66*	1,00	
AssInd	0,23*	0,13	0,00	0,17*	-0,08	0,90*	0,53*	1,00

Примечание. * $p < 0,05$.

Так, в отличие от контрольной выборки, показатель возраста коррелировал только с одной из рассматриваемых цитогенетических характеристик – с уровнем ФАРГ по хромосомам группы D, связь имела отрицательную направленность и невысокую выраженность ($R = 0,18$). В то время как связи суммарного уровня ФАРГ по 10 хромосомам дублируют аналогичные связи в контрольной группе, незначительно варьируют по степени выраженности: уровень сопряженности с показателем ФАРГ по хромосомам группы D был практически одинаков с контрольной группой ($R = 0,62$), уровень сопряженности с показателем ФАРГ хромосом группы G был ниже данных контроля и коэффициент корреляции составлял $R = 0,54$,

вклад в общий уровень ФАРГ количества активных рибосомных цистронов был выше, чем в контроле ($R = 0,58$). Наблюдалась статистически значимая взаимосвязь с количеством ассоциаций акроцентрических хромосом ($R = 0,26$), которой не было в контрольной группе. В отличие от контрольной группы показатель количества ассоциаций акроцентрических хромосом коррелировал с количеством активных рибосомных цистронов ($R = 0,23$) и с показателем уровня ФАРГ по хромосомам группы D ($R = 0,17$). В то же время показатель количества хромосом в ассоциациях, в отличие от контрольной группы, образовывал статистически значимую взаимосвязь лишь с одним признаком – количеством ассоциирующих хромосом ($R = 0,56$).

Изменения в структуре цитогенетических показателей, а также разницу в характере корреляционных взаимосвязей рассматриваемых признаков на статистически значимом уровне подтверждают результаты проведенного дискриминантного анализа. В частности видно, что при ХОБЛ наиболее ценными признаками являются число ассоциаций хромосом, число хромосом в ассоциациях и количество рибосомных цистронов. Критерий Фишера составил 17,03, что значительно превышает теоретически ожидаемый показатель при данных степенях свободы, $F_{\text{табл}} = 3,78$ (табл. 5).

Таблица 5

Величина ЛДФ количественных характеристик ФАРГ больных ХОБЛ и контрольной группы ($F(3,271) = 17,03$, $p < 0,00002$)

Цитогенетические показатели	Ценность признака	p-level
AsCr	45,55	0,0001
CrAs	6,99	0,0087
RC	4,17	0,0427

Заключение

Рибосомные гены на молекулярном уровне обеспечивают работу белоксинтезирующего аппарата клетки. Интенсивность влияет на пролиферацию клеток, которая, в свою очередь, определяет скорость роста и восстановление клеток, тканей, органов, что определяет физиологические регенерационные возможности организма. Можно полагать, что потенциальная возможность любой ткани, и в частности легочной, к регенерации в значительной степени зависит от функциональной активности рибосомных генов.

В результате проведенного исследования, в группе больных ХОБЛ было выявлено увеличение функциональной активности рибосомных генов по таким показателям, как число ассоциаций акроцентрических хромосом и ассоциативный индекс, тогда как в группе контроля данные показатели были значительно ниже. ФАРГ по 10 хромосомам в группе больных ХОБЛ также характеризовалась повышенными значениями, в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, полученные результаты отражают закономерность, согласно которой многие показатели функциональной

активности рибосомных генов у больных хроническим бронхитом отличаются повышенными значениями, нежели чем в группе контроля. Вероятно, данная закономерность может отражать сопротивление организма на возрастающее число патогенных клеток легочной ткани, которые стимулируют процессы регенерации и восстановления клеток через повышение белоксинтезирующей способности.

Работа выполнена в рамках ГК №16.740.11.0746 от 21 октября 2011 г.

Список литературы

1. Авдеев С.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких как системное заболевание // Пульмонология. – 2007. – №2. – С. 104–116.
2. Васильева О.С. Хроническая обструктивная болезнь легких и профессиональные факторы // Пульмонология. – 2007. – №6. – С. 5–11.
3. Особенности клинических проявлений мультифакториальных заболеваний (язвенной болезни, миомы матки, злокачественных лимфом) и модифицирующие эффекты рибосомных генов: монография / В.П. Иванов, Е.В. Трубникова, И.О. Колчанова, О.Ю. Бушуева. – Курск: ГОУ ВПО КГМУ Росздрава, 2008. – 420 с.
4. Современные проблемы в клинической цитогенетике / под ред. Н.П. Кулешова. – М.: Высш. шк., 1991. – 163 с.
5. Чучалин А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания // Пульмонология. – 2008. – №2. – С. 5–14.
6. Шмелев Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания // Пульмонология. – 2007. – №2. – С. 5–9.

References

1. Avdeev S.N. *Pulmonologiya*, 2007, no. 2, pp. 104–116.
2. Vasileva O.S. *Pulmonologiya*, 2007, no. 6, pp. 5–11.
3. Ivanov V.P. *Osobennosti klinicheskikh proyavleniy multifaktorialnykh zabolevaniy (yazvennoybolezni, miomymatki, zlokachestvennykh limfom) imodifitsiruyuschie efekty ribosomnykh genov* (Clinical manifestations of multifactorial diseases (peptic ulcer, myoma of uterus, malignant lymphoma) and modifying effects of ribosomal genes). Kursk, 2008. 420 p.
4. Kuleshov N.P. *Sovremennye problem v klinicheskoytsito genetike* (Modern problems in clinical cytogenetic). Moscow, 1991. 163 p.
5. Chuchalin A.G. *Pulmonologiya*, 2008, no. 2, pp. 5–14.
6. Shmelev E.I. *Pulmonologiya*, 2007, no. 2, pp. 5–9.

Рецензенты:

Полоников А.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск;

Королев В.А., д.б.н., доцент, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета, г. Курск.

Работа поступила в редакцию 30.04.2012.