

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

КОЛЯДА ОЛЕКСАНДР КОСТЯНТИНОВИЧ



УДК: 616.858-008.6-092-078:575.088.7

РОЛЬ МУТАЦІЙ В ГЕНАХ *LRRK2*, *SNCA* ТА *GBA* ТА ПОЛІМОРФНИХ
ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *CYP1A1*, *GSTM1* ТА *APOE*, Ї ДОВЖИНИ ТЕЛОМЕР
У РИЗИКУ РОЗВИТКУ ХВОРОБИ ПАРКІНСОНА

03.00.22 — молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у лабораторії епігенетики Державної установи «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», м. Київ.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
ВАЙСЕРМАН Олександр Михайлович,
Державна установа «Інститут геронтології
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України», завідувач
лабораторії епігенетики.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
ПАНЧУК Ірина Ігорівна,
Чернівецький національний університет імені Юрія
Федьковича, професор кафедри молекулярної генетики
та біотехнології.

доктор біологічних наук, професор
ДУГАН Олексій Мартем'янович,
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря
Сікорського», декан факультету біотехнології і
біотехніки.

Захист відбудеться «27» квітня 2021 р. об 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а., тел/факс: (044) 463 05 32, e- mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а., тел/факс: (044) 463 05 32

Автореферат розісланий «26» березня 2021 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01,
к. б. н., доц.



Н. Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Хвороба Паркінсона (ХП) — один із найважчих і найпоширеніших нейродегенеративних прогресуючих патологічних процесів, який характеризується порушеннями функцій нервової системи (у першу чергу рухових) і системного ураження всього організму (Balestrino R., Schapira A. H. V., 2020; Zafar S., Yaddanapudi S. S., 2020).

На теперішній час ХП вважають поліетіологічним, багатофакторним захворюванням, у розвитку якого відіграють роль чинники як зовнішні, так і внутрішні, зокрема, спадковість (Clarimón J., 2020). Морфофункціональним субстратом ХП є дегенерація і загибель нейронів чорної субстанції стовбурової частини головного мозку. Існують численні механізми реалізації цього патологічного процесу (Bologna M. et al., 2020; Pahwa R. et al., 2020). Окремі дослідники розділяють генетично обумовлену та ідіопатичну форми ХП (Correia G. L. et al., 2020; Emmanouilidou E. et al., 2020), але лавиноподібні досягнення останніх років на теренах клінічної генетики ХП настільки значні, що деякі механізми, зокрема, перехресні з іншою, коморбідною, патологією знаходять генетичне обґрунтування і в будь-якому випадку сприяють розвитку діагностичних, прогностичних та навіть лікувальних підходів до цієї патології (Smolders S. et al., 2020; Bandres-Ciga S. et al., 2020; Arjmand B. et al., 2020). Наріжним каменем успішного розв'язання медичних проблем ХП є своєчасні діагностика, профілактика, адекватне лікування (Espay A. J., 2020; Armstrong M. J., 2020).

Вивчення ролі спадкової схильності в етіології ХП почалися ще на початку минулого століття. Для підтвердження цієї гіпотези вчені проводили низку близнюкових досліджень, однак їхні результати не були однозначними. Вперше цей метод застосував Duvoisin R. C. et al. (1981) при вивченні 12 монозиготних пар близнюків дійшовши до висновку, що існує нульова конкордантність для ХП у досліджуваних пар і що генетичні фактори не відіграють великої ролі в етіології ХП. Пізніше, (R. J. Marttila et al., 1988) при вивченні фінської близнюкової когорти встановили 42 випадки ХП у 41 пар близнюків, включаючи 18 монозиготних, 14 дизиготних пар і 9 пар невизначеної зиготи. Тільки одна дизиготна пара була конкорданта по ХП; всі інші пари були дискордантні. Таким чином, була встановлена низька конкордантність ХП як у монозиготних, так і у дизиготних парах близнюків. Однак починаючи з 1990-х років, завдяки появі нових методів дослідження були переглянуті дані, отримані при вивченні генетичних особливостей ХП. Розвиток молекулярних методів дав можливість ідентифікувати окремі молекулярно-генетичні маркери, що спричиняють дане захворювання. На сьогоднішній день не викликає сумнівів існування низки конститутивних генетичних чинників, які визначають схильність конкретної особи до розвитку ХП; проте питання співвідношення цих чинників, їх популяційної специфічності, а також цілеспрямованої профілактики, заснованої на виділенні групи ризику, до теперішнього часу розроблені недостатньо.

Дослідження генетичних особливостей (алельних варіантів генів) представляє безперечний інтерес (Leonard H. et al., 2020; Blauwendraat C. et al., 2020). Результати асоціативних досліджень деколи суперечливі, але вони дозволяють з'ясувати внесок певних генів і поліморфізмів в маніфестацію і розвиток захворювання, а також розробити набір ДНК-тестів для медико-генетичної діагностики в різних етнічних групах.

Все викладене вище свідчить про низку невирішених питань щодо цієї проблеми та підкреслює її актуальність.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводилося на клінічній базі ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України». Дисертаційне дослідження є частиною науково-дослідної роботи «Поліморфізм генів *GBA*, *LRRK2*, *PARK2*, *SNCA* та *PINK1* при хворобі Паркінсона» (державний номер реєстрації 0113U002113, 01.01.2014–31.12.2016), в якій автор був одним із виконавців.

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було вивчення ролі мутацій та поліморфних варіантів низки генів, а також довжини теломер у розвитку ХП.

Для досягнення поставленої мети сформульовано наступні завдання:

1. Проаналізувати частоту мутації в гені с.6055G>A в гені *LRRK2*;
2. Проаналізувати частоту мутацій с.1448T>C та с.1226A>G в гені *GBA*;
3. Проаналізувати частоту мутації с.209G>A гена *SNCA*;
4. Оцінити асоціацію ризику розвитку ХП з носійством алельних варіантів гена *CYP1A1*;
5. Оцінити асоціацію ризику розвитку ХП з носійством алельних варіантів гена *GSTM*;
6. Оцінити асоціацію ризику розвитку ХП з носійством алельних варіантів гена *APOE*;
7. Визначити довжину теломерних ділянок хромосом в лейкоцитах та клітинах букального епітелію у пацієнтів з ХП та осіб контрольної групи.

Об'єкт дослідження: спадкова природа хвороби Паркінсона.

Предмет дослідження: молекулярно-генетичні аспекти спадкової схильності до хвороби Паркінсона.

Методи дослідження: виділення та очищення ДНК; ампліфікація послідовностей ДНК за допомогою ПЛР; ідентифікація мутацій методом рестрикційного аналізу; електрофоретичне розділення фрагментів ДНК; ідентифікація мутацій методом ПЛР в реальному часі; визначення довжини теломерних повторів методом ПЛР в реальному часі; статистична обробка отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше:

- створено банк ДНК 216 пацієнтів зі встановленим діагнозом ХП та 300 людей відповідного віку без неврологічних порушень з України;

- проведено генотипування та встановлено частоти алелей і генотипів, показники фактичної та теоретичної гетерозиготності за мутаціями генів, асоційованих з ХП (*LRRK2*, *SNCA*, *GBA*), та поліморфними варіантами генів *CYP1A1*, *GSTM1*, та *APOE* в групі пацієнтів з України;

- визначено довжину теломерних ділянок в лейкоцитах та клітинах буккального епітелію у пацієнтів з України.

Розв'язання поставлених завдань надало змогу поглибити уявлення про молекулярно-генетичні аспекти механізмів, які лежать в основі патогенезу, або асоційовані з ХП, зокрема, однонуклеотидну заміну с.6055G>A в гені *LRRK2*, г.85907C>A в гені *SNCA*, с.1448T>C та с.1226A>G в гені *GBA*, алельний поліморфізм с.1384A>G у 7-му екзоні гену *CYP1A1*, гомозиготну делецію у гені *GSTM1* (генотип +/-del), алельний поліморфізм гену *APOE*, довжини теломер.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено молекулярно-генетичні методи для визначення маркерів генетичної схильності до ХП. Показано, що у рамках молекулярно-генетичного тестування пацієнтів з ХП та членів їх родин доцільним є генотипування за мутаціями с.6055G>A в гені *LRRK2*, с.1448T>C та с.1226A>G в гені *GBA*, а також оцінка алельного поліморфізму с.1384A>G у 7-му екзоні гену *CYP1A1*, гомозиготної делеції у гені *GSTM1* (генотип +/-del), алельного поліморфізму гена *APOE*.

Результати проведеного дослідження надають наукове обґрунтування розробці нових підходів до діагностики й прогнозування ХП, виявлення груп ризику на основі даних генотипування. Отримані в роботі результати можуть бути використані в діагностиці та медико-генетичному консультуванні пацієнтів та членів їх родин.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем спільно з науковим керівником обґрунтовано актуальність дослідження, визначено мету та завдання. Самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, розроблено дизайн дослідження, облікові карти обстеженого контингенту, виконано біологічну частину роботи, здійснено статистичний аналіз й інтерпретацію результатів, а також сформульовано висновки. Автором написано всі розділи дисертації, автореферат та взято участь у складанні друкованих матеріалів і доповідей за матеріалами дослідження.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися і обговорювалися на: IV міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (9–11 жовтня, 2012, м. Київ, Україна); VII міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (20–23 листопада, 2012, м. Харків, Україна); Міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: біологічні науки» (19–23 березня, 2012, Київ, Україна); X міжнародному симпозіумі «Биологические механизмы старения», (16–19 травня, 2012, Харків, Україна); V международной школе молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома», (3–7 декабря, 2012, Звенигород, Россия); VIII міжнародній конференції молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (3–6 грудня, 2013, Харків, Україна); III міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих

вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (24–27 лютого, 2014, Донецьк, Україна), X Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (14–18 вересня, 2015, Чернівці, Україна); VI Національному конгресі геронтологів і геріатрів України (19–21 жовтня, 2016, Київ); IV конференції «Екстрапірамідні захворювання: клініка, діагностика, лікування (2–3 листопада, 2017, Київ, Україна).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, з них 5 статей у фахових українських і зарубіжних виданнях, 6 тез доповідей у матеріалах українських і міжнародних конференцій, симпозіумів та з'їздів. Новітні положення захищено одним патентом на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із анотації, вступу, огляду наукової літератури, опису матеріалів та методів досліджень, трьох розділів власних досліджень з аналізом отриманих даних, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатку.

Дисертацію викладено на 176 сторінках друкарського тексту, який містить 13 таблиць, 7 рисунків. Бібліографія включає 606 джерел, із них кирилицею — 18, латиницею — 588.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляд літератури) узагальнені літературні дані щодо патогенезу захворювання та генетичні чинники, що призводять до ХП. Охарактеризовано основні гени, залучені в патогенез захворювання та описані особливості їх наслідування та молекулярна роль їх продуктів. Особливу увагу зосереджено на генах біотрансформації ксенобіотиків, деяких кіназах, генах ліпідного обміну. В результаті аналізу літератури показано перспективність дослідження генетичних маркерів для діагностики ХП та розуміння молекулярних причин захворювання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проспективне дослідження проведено на базі ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова» НАМН України за участю 216 пацієнтів з ХП та 300 здорових осіб групи контролю.

Матеріалом дослідження слугували зразки крові та буккального епітелію пацієнтів із діагнозом ХП та клінічно здорових людей. Обстежено 216 пацієнтів із ХП (106 чоловіків та 110 жінок), середній вік $63,1 \pm 1,3$ (38–78) років, із середньою тривалістю захворювання $7,6 \pm 0,33$ роки. Діагноз ХП встановлювали відповідно до міжнародних критеріїв, рухові функції оцінювали за допомогою шкали Hoehn и Yahr та частини III UPDRS в період «включення» протипаркінсонічних засобів, що використовувалися.

З дебютом хвороби у віці до 50 років було досліджено 59 (27 %) людей, в 51–60 років — 90 (43 %), в 61–70 років — 56 (25 %) та старше 71 року — 11 (5 %).

Середній вік прояву симптомів 51 ± 1 (32–69) років. Переважно акінетичні форми діагностували у 55 людей (25 %), брадикінетичні — у 112 (52 %), з переважанням тремору — у 49 (23 %). Середній бал по III частині уніфікованої рейтингової шкали ХП UPDRS становив $39,19 \pm 10,2$. У 30 пацієнтів встановлено наявність прямого родича з симптомами паркінсонізму, що дає можливість віднести цих пацієнтів до групи з умовно сімейною формою захворювання. До контрольної групи входили 300 людей без клінічних проявів захворювання, домірних з основною групою за віком та статтю.

ДНК виділяли з периферичної крові методом фенольно-хлороформної екстракції. Для цього кров набирали в пробірки з консервантом, у якості якого використано етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА). Для виділення ДНК до 2 мл цільної крові додавали 10 мл буферу для лізису (320 мМ сахарози, 1 % тритон X-100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-НСl, рН 7,6) та центрифугували 20 хв за частоти обертання 4000 об./хв. До осаду додавали 5 мл лізуючого буфера і повторно центрифугували протягом 7 хв за тих самих умов. До осаду додавали 600 мкл буфера (25 мМ ЕДТА, рН 8,0; 75 мМ NaCl) та перемішували. Додавали 40 мкл 10 % розчину додецилсульфату натрію, 15 мкл протеїнази К (10 мг/мл) і інкубували за 37 °С протягом 3 годин.

Подальше виділення ДНК проводили в три етапи: розчином фенолу (1:2), сумішню фенол-хлороформ (1:1) і хлороформом (1:1). Розчин центрифугували за 13 000 об./хв, 5 хвилин, ДНК осаджували розчином етанолу. Отриману ДНК висушували за 37 °С з подальшим розчиненням у трис-ЕДТА та зберігали за -80 °С.

Ампліфікацію послідовностей проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на термоциклері «Research PCR Thermal Cycler» (Corbett, Австралія). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила по 2 мкл суміші праймерів, 5 мкл ДНК, 5 мкл реакційної суміші «MasterMix» (Сінтол, РФ) та 13 мкл води, обробленої диетилопірокарбонатом.

Для підбору послідовностей олігонуклеотидних праймерів використовували базу даних NCBI з пошуковою системою BLAST PRIMER (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Для визначення однонуклеотидних заміни проводили гідроліз ампліфікованих фрагментів відповідною рестриктазою, дотримуючись рекомендацій фірми виробника (Fermentas, Литва). Аналіз послідовностей на наявність сайтів впізнавання ендонуклеаз рестрикції проводили з використанням онлайн ресурсу NEBcutter (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168933/>).

Аналіз мононуклеотидної заміни с.6055G>А гена *LRRK2*. Для отримання продукту ампліфікації гена *LRRK2* були використані олігонуклеотидні праймери LRRK2F та LRRK2R. Концентрація MgCl₂ в реакційній суміші становила 2,5 мМ. ПЛР проводили за наступною схемою: денатурація 5 хв при 94 °С; 30 циклів: денатурація — 45 с при 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с при 55 °С, елонгація — 45 с при 72 °С; постампліфікаційна елонгація — 10 хв при 72 °С.

Наявність продуктів ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. У випадку успішного проведення ПЛР у зразки додавали по 2

од. ендонуклеази рестрикції SfcI та по 3 мкл стандартного буфера Tango (Fermentas, Литва) та інкубували при температурі 36 °C впродовж 12 годин. Продукти рестрикції ампліфікованої послідовності аналізували за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. ДНК забарвлювали бромистим етидієм і сканували на УФ-транслюмінаторі. Наявність фрагментів розміром 228 та 101 п. н. відповідала гомозиготному стану с.6055GG, наявність фрагментів 228, 207, 101 та 21 п. н. відповідала гетерозиготному стану за поліморфізмом с.6055G>A.

Аналіз однонуклеотидної заміни g.85907C>A гена *SNCA*. Для визначення мутації g.85907C>A в гені *SNCA* проводили ПЛР з детекцією флуорисценції в реальному часі на термоциклері «Rotor Gene 6000» (Corbett, Австралія). Для ампліфікації використовували готові реакційні суміші Сінтол (Росія). Реакцію проводили в об'ємі 25 мкл згідно протоколу: денатурація 5 хв при 94 °C; 30 циклів: денатурація — 45 с при 94 °C, відпалювання праймерів — 30 с при 60 °C, елонгація — 45 с при 72 °C; постампліфікаційна елонгація — 10 хв при 72 °C. Детекція флуоресценції проводилась після стадії елонгації.

Аналіз однонуклеотидної заміни с.1448T>C гена *GBA*. Для отримання продукту ампліфікації ділянки гена *GBA* були використані олігонуклеотидні праймери GBAF та GBAR. Концентрація MgCl₂ в реакційній суміші становила 4 mM. ПЛР проводили за наступною схемою: денатурація 5 хв при 94 °C; 30 циклів: денатурація — 45 с при 94 °C, відпалювання праймерів — 30 с при 60 °C, елонгація — 45 с при 72 °C; постампліфікаційна елонгація — 10 хв при 72 °C.

Наявність продуктів ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. У випадку успішного проведення ПЛР у зразки додавали по 2 од. ендонуклеази рестрикції MspI та по 3 мкл стандартного буфера Tango (Fermentas, Литва) та інкубували при температурі 65 °C упродовж 4 годин. Продукти рестрикції ампліконів аналізували за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі з подальшим фарбуванням бромистим етидієм. Наявність гетерозиготного носійства встановлювали за наявності продуктів рестрикції розміром 203, 138, 56 та 9 п. н.

Аналіз однонуклеотидної заміни с.1226A>G гена *GBA*. Для отримання продукту ампліфікації ділянки гена *GBA* було використано олігонуклеотидні праймери GBA2F та GBA2R. Концентрація MgCl₂ в реакційній суміші становила 2 mM. ПЛР проводили за наступною схемою: денатурація 5 хв при 94 °C; 30 циклів: денатурація — 45 с при 94 °C, відпалювання праймерів — 30 с при 54 °C, елонгація — 45 с при 72 °C; постампліфікаційна елонгація — 10 хв при 72 °C.

Наявність продуктів ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. У випадку успішного проведення ПЛР у зразки додавали по 1 од. ендонуклеази рестрикції XhoI та по 3 мкл стандартного буфера Tango (Fermentas, Литва). Суміш інкубували при температурі 36 °C впродовж 12 годин. Продукти рестрикції ампліконів аналізували за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі з подальшим фарбуванням бромистим етидієм. Наявність гетерозиготного носійства встановлювали при наявності продуктів рестрикції розміром 105, 89 та 16 п. н.

Аналіз одонуклеотидної заміни с.1384А>G гена *CYP1A1*. Для отримання продукту ампліфікації ділянки гена *CYP1A1* були використані олігонуклеотидні праймери CYPF та CYPR. Концентрація MgCl₂ в реакційній суміші становила 3 мМ. ПЛР проводили за наступною схемою: денатурація 5 хв при 94 °С; 30 циклів: денатурація — 45 с при 94 °С, відпалювання праймерів — 30 с при 54 °С, елонгація — 45 с при 72 °С; постампліфікаційна елонгація — 10 хв при 72 °С. У випадку успішного проведення ПЛР у зразки додавали по 1 од. акт. ендонуклеази рестрикції HруСН4Ш та по 3 мкл стандартного буфера Tango (Fermentas, Литва). Інкубували при відповідній температурі (36 °С) впродовж двох годин. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. Гелі фарбували бромистим етидієм і сканували на УФ-транслюмінаторі. Наявність с.1384А алеля визначали за присутності негідролізованого продукту розміром 199 п. н., а с.1384G алелі при утворенні продуктів рестрикції розміром 116 та 83 п. н.

Аналіз делеції гена *GSTM1*. Для отримання продукту ампліфікації ділянки гена *GSTM1* були використані олігонуклеотидні праймери GSTMF та GSTMR. Концентрація MgCl₂ в реакційній суміші становила 2,5 мМ. ПЛР проводили за наступною схемою: денатурація 5 хв при 94 °С; 30 циклів: денатурація — 30 с при 94 °С, відпалювання праймерів — 30 с при 53 °С, елонгація — 30 с при 72 °С; постампліфікаційна елонгація — 10 хв при 72 °С.

Продукти ампліфікації аналізували за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. Гелі фарбували бромистим етидієм і сканували на УФ-транслюмінаторі. За відсутності ампліконів зразок ідентифікували як той, що належить носію нульового генотипу.

Аналіз e2/e3/e4 поліморфізму гена *APOE*. Для отримання продукту ампліфікації ділянки гена *APOE* були використані олігонуклеотидні праймери APOF та APOR. Концентрація MgCl₂ в реакційній суміші становила 4 мМ. ПЛР проводили за наступною схемою: денатурація 5 хв при 94 °С; 30 циклів: денатурація — 45 с при 94 °С, відпалювання праймерів — 30 с при 55 °С, елонгація — 45 с при 72 °С; постампліфікаційна елонгація — 10 хв при 72 °С. У випадку успішного проведення ПЛР у зразки додавали по 1 од. акт. ендонуклеази рестрикції HhaI та по 3 мкл стандартного буфера Tango (Fermentas, Литва) та інкубували при температурі 36 °С упродовж 6 годин. Продукти реакції аналізували за допомогою електрофорезу в 7 % поліакриламідному гелі (склад — акриламід та метіленбісакриламід — у пропорції 29:1). Електрофорез проводився в ТВЕ буфері (рН = 8,0) при напрузі 300 В. Перед нанесенням на гель пробки змішували у співвідношенні 1:1 з буфером для внесення зразків (Fermentas, Литва). Гелі фарбували бромистим етидієм. Продукти рестрикції розміром 145 п. н., 168 п. н. та 195 п. н. ідентифікували як e3, e2, та e4, алелі відповідно.

Визначення довжини теломерного повтору проводили методом ПЛР в реальному часі за протоколом (Cawton R. M., 2002, 2009). Ампліфікацію проводили за наступним протоколом. В пробірки об'ємом 0,2 мл вносили 5 мкл реакційної суміші, 10 мкл води, обробленої диетилпірокарбонатом, та 5 мкл суміші праймерів.

В останню чергу додавали 5 мкл ДНК. Ампліфікацію проводила в такому режимі: активація полімерази при 95 °С протягом 8 хв, 5 циклів: денатурація 94° С протягом 20 с; відпалювання та елонгація 50 °С протягом 25 с, 40 циклів: денатурація 94 °С протягом 60 с, відпал та елонгація 62 °С при 25 с.

Відносно довжину теломер оцінювали за показником T/S, який розраховували як відношення числа копій теломерних повторів до числа копій гена альбуміну відповідно до стандартного протоколу (Cawton R. M., 2002, 2009).

Частоти алелів та генотипів, фактичну та теоретичну гетерозиготність, оцінку відповідності фактичного розподілу генотипів до очікуваного при рівновазі за Харді-Вайнбергом проводили за допомогою пакету програм Генерор v. 1.2. Асоціацію певних генотипів з ХП оцінювали за допомогою розрахунку співвідношення шансів (odds ratio, OR). Відносний ризик OR розраховували за стандартною формулою.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Здійснено генотипування та встановлено частоти алелей і генотипів, показники фактичної та теоретичної гетерозиготності за мажорними мутаціями генів, асоційованих з ХП (*LRRK2*, *SNCA*, *GBA*).

З метою з'ясування ролі мутації с.6055G>A в розвитку ХП спочатку було проведено аналіз даної мутації серед 216 пацієнтів із ХП (116 чоловіків та 100 жінок, середній вік — 65,0 ± 0,7). Контрольна група включала 300 людей (200 чоловіків та 100 жінок, середній вік — 67,0 ± 0,4).

Було проведено генотипування мутації с.6055G>A в 41-му екзоні гену *LRRK2*, яка призводить до заміни залишку гліцину на залишок серину у позиції 219 білка, який кодується даним геном. Генотипування проводили методом ПДРФ-ПЛР. За результатами генотипування учасників контрольної групи було встановлено, що серед них відсутні носії алелі А. Таким чином, в контрольній групі, що складалася зі здорових людей, було виявлено лише гомозиготи за нормальною алеллю G із генотипом с.6055GG. Відповідно, генотипи с.6055AA та с.6055AG виявлено не було.

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в досліджуваних групах для перевірки випадковості розподілу генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга не дав результатів. Так як у контрольній групі виявились відсутніми гетерозиготи (носії генотипу с.6055AG).

В результаті дослідження групи пацієнтів з ХП було виявлено 4 гетерозиготних носія заміни с.6055G>A в гені *LRRK2* та 212 індивідів гомозигот за нормальною алеллю гена *LRRK2* (с.6055GG). Було розраховано, що частота гетерозигот з мононуклеотидною заміною с.6055G>A для даної групи становить 1,86 %, а частота гомозигот с.6055GG — відповідно 98,14. Таким чином, частота мутантної алелі с.6055A в групі пацієнтів з ХП складає 0,93 %.

Нами було проведено перевірку відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в досліджуваній групі пацієнтів з ХП. Так фактична гетерозиготність за однонуклеотидною заміною с.6055G>A складала 0,04, а теоретична 0,036 ($\chi^2 = 0,0189$, $p > 0,05$). Проведений аналіз свідчить про відсутність

відхилень в розподілі генотипів у нашій групі від очікуваного розподілу. Що говорить про випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнбергом. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що дана група може вважатися репрезентативною.

Цікаво, що генотип с.6055AA був відсутній як серед контрольної групи, так і серед пацієнтів. Подібні тенденції спостерігались і в дослідженнях інших популяцій, що імовірно пов'язано із низькою частотою даної алелі, або з летальністю генотипу AA.

Оскільки за нашими даними гетерозиготні носії мутації с.6055G>A в гені *LRRK2* зустрічалися винятково в групі пацієнтів з ХП, можна зробити висновок, що дана мутація може бути одним з факторів, що спричинюють розвиток ХП в Україні. Кількісно оцінити асоціацію певних генотипів із ХП планували за допомогою розрахунку співвідношення шансів (odds ratio, OR), однак за відсутності гетерозигот у контрольній групі такі розрахунки провести неможливо.

Досліджувана мутація належить до найпоширеніших мутацій гену *LRRK2*. Її частота у європейських країнах складає 4,6 % у пацієнтів зі спорадичною формою ХП та 11,5 % осіб із сімейною формою ХП. За деякими даними, у євреїв Ашкеназі частота зазначеної мутації може сягати 13,3 % пацієнтів зі спорадичною формою ХП та 29,7 % у осіб із сімейною формою ХП. У жителів Росії дана мутація виявляється у 13 % та у 0,5 % пацієнтів із сімейною та спорадичною формами відповідно. Є дані про високу частоту мутації с.6055G>A у арабів Північної Африки, у яких вона складає 40,8% пацієнтів зі спорадичною формою та 37,0 % — у осіб із сімейною формою ХП. В той же час, описана однонуклеотидна заміна вкрай рідко зустрічається у представників монголоїдної раси.

Нами було також проведено дослідження частоти мутації гену *SNCA* — g.85907C>A — у жителів України. Відомо, що у пацієнтів з мутаціями в даному гені перші ознаки хвороби з'являються до 50 років, перебіг хвороби дуже швидкий і часто характеризується зниженням когнітивних функцій (Bras J. M. et al., 2005).

За результатами генотипування було встановлено, що мутантні алелі відсутні як серед учасників контрольної групи, так і серед групи пацієнтів з ХП, що, імовірно, пов'язано із надзвичайно низькою частотою даної мутації або її повною відсутністю у жителів певної території. Такий результат співпадає із даними отриманими в аналогічних дослідженнях, проведених для інших популяцій. Оскільки мутації у досліджуваному гені зустрічаються з достатньо низькою частотою, і, в той же час, продукт гену *SNCA* є безпосередньо залученим у патогенез захворювання, перспективним є пошук мутацій у регуляторних ділянках гена, які на даний момент є мало дослідженими.

Також нами було проведено дослідження гену *GBA*, який кодує глюкоцереброзидазу. За умови нестачі даного ферменту лізосомальні макромолекули накопичуються у різних клітинах організму, особливо у нейронах. Подібне накопичення жиркових відкладень у мозку порушує його кровопостачання, що, в свою чергу, призводить до зниження функціональності та активності структур

мозку. Численні дані свідчать про підвищених ризик розвитку ХП, асоційований із гетерозиготним носійством мутацій у даному гені.

З метою з'ясування ролі мутації с.1448Т>С в 10-му екзоні гена *GBA* в розвитку ХП було проведено аналіз даної мутації серед 216-ти пацієнтів із ХП та у контрольній групі.

Було проведено генотипування мутації с.1448Т>С в 10-му екзоні гена *GBA*. Генотипування проводили методом ПДРФ-ПЛР. За результатами генотипування серед учасників контрольної групи було встановлено, що серед них відсутні носії алелі С. Таким чином, було виявлено лише гомозиготи за нормальною алеллю Т із генотипом с.1448ТТ і частота алелі Т у контрольній групі становила 100%. Відповідно, генотипи с.1448ТС та с.1448СС виявились відсутніми.

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в досліджуваних групах для перевірки випадковості розподілу генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга не дав результатів. Так як у контрольній групі виявились відсутніми гетерозиготи (носії генотипу с.1448ТС).

У групі пацієнтів з ХП було виявлено 4 гетерозиготних носії мутації с.1448Т>С. Частота гетерозиготного генотипу с.1448ТС склала 1,86, а гомозиготного генотипу с.1448ТТ — 98,14. Таким чином, частота алелі с.1448С складає 0,93 %.

Нами було проведено перевірку відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в досліджуваній групі пацієнтів з ХП. Так фактична гетерозиготність за одонуклеотидною заміною с.1448Т>С складала 0,04 а теоретична 0,036 ($\chi^2 = 0,0189$, $p > 0,05$). Проведений аналіз свідчить про відсутність відхилень в розподілі генотипів у нашій групі від очікуваного розподілу. Це свідчить про випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнбергом. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що дана група може вважатися репрезентативною.

Цікаво, що ані в контрольній групі, ані в групі пацієнтів з ХП не було виявлено гомозигот за алеллю с.1448С.

Наявність гетерозиготних носіїв мутації с.1448Т>С в гені *GBA* винятково в групі пацієнтів з ХП свідчить про те, що дана мутація може бути одним з факторів, що спричинюють розвиток ХП в Україні. Однак кількісна оцінка асоціації генотипу с.1448ТС з розвитком ХП є неможливою через відсутність гетерозигот у контрольній групі.

Нами також було досліджено частоту ще одної поширеної мутації гену *GBA* с.1226А>G. Було проведено аналіз даної мутації серед 216 пацієнтів із ХП (116 чоловіків та 100 жінок, середній вік – $65,0 \pm 0,7$) та у контрольній групі з 300 людей (200 чоловіків та 100 жінок, середній вік – $67,0 \pm 0,4$).

Генотипування мутації с.1226А>G було проведено методом ПДРФ-ПЛР. За результатами генотипування учасників контрольної групи було виявлено винятково гомозиготи за нормальною алеллю А із генотипом с.1226АА. Відповідно, було встановлено, що в контрольній групі відсутні як гетерозиготи с.1226АG, так і гомозиготи с.1226GG за мутантною алеллю с.1226G. Такий результат співпадає із даними отриманими в аналогічних дослідженнях, проведених для інших популяцій.

Оскільки гетерозиготних носіїв мутантної алелі не було виявлено серед представників контрольної групи оцінити гетерозиготність за методом Россета-Раймонда було неможливо.

У групі пацієнтів з ХП генотип с.1226АА зустрічався з частотою 98,61 %, а генотип с.1226АG — 1,39 %. Таким чином, частоти алелей склали 99,3 % для с.1226А та 0,69 % для с.1226G.

Нами було проведено перевірку відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в досліджуваній групі пацієнтів з ХП. Так фактична гетерозиготність за одонуклеотидною заміною с.1226А>G складала 0,03 а теоретична 0,029 ($\chi^2 = 0,0106$, $p > 0,05$). Проведений аналіз свідчить про відсутність відхилень в розподілі генотипів у нашій групі від очікуваного розподілу. Що говорить про випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнбергом. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що дана група може вважатися репрезентативною.

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в контрольній групі для перевірки випадковості розподілу генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга не дав результатів, так як у контрольній групі виявились відсутніми гетерозиготні носії.

Цікаво, що ані в контрольній групі, ані в групі пацієнтів з ХП не було виявлено гомозигот за мутантною алеллю с.1226GG.

Оскільки гетерозиготні носії мутації с.1226А>G в гені *GBA* зустрічаються винятково в групі пацієнтів з ХП, є підстави стверджувати, що дана мутація може бути одним з факторів, що спричинюють розвиток ХП у населення України. Планувалось кількісно оцінити асоціацію генотипу с.1226АG з розвитком ХП, проте у зв'язку з відсутністю гетерозигот у контрольній групі такі розрахунки було неможливо провести.

Дане дослідження мутантних варіантів гену *GBA* у пацієнтів з ХП є першим для України. Однак, подібні дослідження активно проводяться в інших країнах. Так було показано, що серед євреїв Ашкеназі гетерозиготні носії даної мутації гену *GBA* зустрічаються із частотою 10,7–31,3 % серед пацієнтів з ХП. Частота мутації у пацієнтів, які належать до інших етнічних груп, складає 2,3–9,4 %. Кількість носіїв мутацій гену *GBA* в італійській популяції складає 4,5 % серед пацієнтів з ХП та 0,63 % у контрольній групі. Серед випадків сімейної форми ХП у жителів США було виявлено 4,1 % носіїв мутацій у порівнянні з 1,1 % у контрольній групі. Також було встановлено, що мутації гену *GBA* зустрічаються у 14,7 % пацієнтів з сімейною формою ХП у Японії.

Проведено генотипування та встановлено частоти алелей і генотипів, показники фактичної та теоретичної гетерозиготності за поліморфізмами генів *CYP1A1*, *GSTM1*, та *APOE* в групі пацієнтів з України.

Нами було досліджено частоту одонуклеотидної заміни в гені *CYP1A1* — с.1384А>G. *CYP1A1* є одним із перших виявлених цитохромів, що бере участь у метаболізмі великого спектру речовин, включно з таким відомим канцерогеном, як бензапірен (Баранов В. С. и соавт., 2000). Даний ген відповідає за синтез цитохрому

P450 — білку, що є залученим до першої фази біотрансформації ксенобіотиків (Gasser T., 2005). Досліджуваний поліморфізм є обумовленим однонуклеотидною заміною у 7-му екзоні, що призводить до заміни ізолейцину на валін у поліпептидному ланцюгу білку.

Для генотипування за однонуклеотидною заміною с.1384А>G використовували метод ПДРФ-ПЛР (табл. 1).

Таблиця 1

Розподіл генотипів за однонуклеотидною заміною с.1384А>G в гені *CYP1A1*

Генотипи	Група пацієнтів з ХП, кількість осіб (частота алеля) n = 216	Контрольна група, кількість осіб (частота алеля) n = 300	χ^2	p	OR	
					Знач.	95 % CI
с.1384AA	75 (0,35)	184 (0,61)	36,69	1,0E-8	0,34	0,23–0,48
с.1384AG	126 (0,58)	108 (0,36)			2,49	1,74–3,56
с.1384GG	15 (0,07)	8 (0,03)			2,72	1,13–6,55

За результатами генотипування учасників контрольної групи було виявлено, що частота алелі с.1384А склала 0,79, в той час, як частота алелі с.1384G становила 0,21. Відповідно, частота гомозигот з генотипом с.1384AA становила 0,61, частота гетерозигот с.1384AC — 0,36, а частота гомозигот с.1384GG — 0,03.

У групі пацієнтів з ХП частота алелей с.1384А та с.1384G склала 0,64 та 0,36, відповідно. Частоти генотипів становили — 0,35 (с.1384AA), 0,58 (с.1384AG) і 0,07 (с.1384GG).

Нами було проведено перевірку відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в контрольній групі здорових людей. Так, фактична гетерозиготність за однонуклеотидною заміною с.1384А>G складала 0,36, а теоретична 0,032 ($\chi^2 = 2,8729$, $p > 0,05$). Проведений аналіз свідчить про відсутність відхилень в розподілі генотипів у нашій групі від очікуваного розподілу. Що говорить про випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнбергом. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що дана група може вважатися репрезентативною.

Також було проведено перевірку відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в групі пацієнтів з ХП. В цій групі фактична гетерозиготність за однонуклеотидною заміною с.1384А>G складала 0,58, а теоретична 0,045 ($\chi^2 = 15,0788$, $p > 0,05$). Проведений аналіз свідчить про не випадковий розподіл генотипів відповідно до рівноваги за Харді-Вайнбергом в групі пацієнтів з ХП.

Перевірка за критерієм χ^2 показала достовірну різницю між частотами генотипів розрахованими для контрольної групи та для групи пацієнтів з ХП ($df = 1$, $p < 0,05$).

Показник OR для гетерозиготного генотипу за однонуклеотидної заміни с.1384A>G в гені *CYP1A1* склав 2,49 (95% CI: [1,74–3,56]). Для гомозиготного за рідкою алеллю генотипу OR склав 2,72 (95% CI: [1,13–6,55]).

Показник OR для алелі с.1384G склав 1,76 (95 % CI: [1,30–2,39]), що свідчить про те, що присутність у генотипі алелі с.1384G підвищує ризик захворіти на ХП в 1,76 разів.

Наші дані підтверджують отримані раніше результати японських учених, що досліджували 126 пацієнтів з ХП та 176 здорових осіб. Ними було виявлено, що частота алелі, що призводила до зниження активності ферменту була значно вищою у групі пацієнтів з ХП, ніж у контрольній групі і складала, відповідно, 44,4 % та 34,9 %. Ризик розвитку ХП у пацієнтів з генотипом с.1384GA був у 6,54 рази вищий, ніж у носіїв нормального генотипу с.1384AA ($p < 0,001$). Водночас, у дослідженні зв'язку ХП з поліморфізмом гену *CYP1A1* серед жителів Китаю достовірних відмінностей між групою пацієнтів з ХП та контролем виявлено не було. У британському дослідженні під час генотипування 176 пацієнтів зі спорадичною формою ХП та 30 пацієнтів з сімейною формою ХП так само не було виявлено достовірної різниці порівняно з контрольною групою.

Також нами було досліджено частоту гомозиготної делеції у гені *GSTM1* у жителів України. Ген *GSTM1* належить до сімейства генів глутатіон-S-трансфераз, що беруть участь у процесі детоксикації мутагенів та інших ксенобіотиків. Глутатіон-S-трансфераза каталізує взаємодію глутамата з атомами вуглецю, азоту, сірки та кисню у широкому спектрі сполук.

Гени сімейства глутатіон-S-трансфераз можуть брати участь у патогенезі ХП, оскільки дані ферменти є антиоксидантами, а при ХП важливу роль відіграє усунення супероксидних радикалів ферментами. Крім того, вважається, що ген *GSTM1* пов'язаний з метаболізмом дофаміну, обмін якого особливо порушується при патології. За даним геном виділяють два генотипи (+ та del), і вважається, що носійство del генотипу підвищує ризик різноманітних захворювань дихальних шляхів, розвитку пухлин, а також розвитку ХП.

Для встановлення ролі гену *GSTM1* у підвищенні ризику розвитку ХП було проведено аналіз частот відповідних генотипів серед пацієнтів із ХП та у контрольній групі.

За результатами генотипування було виявлено, що частота + генотипу склала 0,67, а частота генотипу del склала 0,33 серед представників контрольної групи. У групі пацієнтів з ХП дані показники розподілу генотипів суттєво відрізнялись: частоти генотипу + та генотипу del склали 0,55 та 0,45, відповідно. Достовірність різниці перевіряли за допомогою критерію χ^2 ($df = 1$, $P < 0,05$). Провести аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним для перевірки випадковості розподілу генотипів відповідно до співвідношення Харді-Вайнберга є неможливим. Так як особливістю метода є одночасне виявлення гомозиготних та гетерозиготних носіїв однонуклеотидної заміни.

Показана статистично достовірна різниця частоти мутантного генотипу del свідчить про можливу роль даного генотипу у розвитку ХП у населення України.

Показник OR для генотипу del склав 1,65 (95 % CI: 1,15–2,37), що свідчить про те, що наявність гомозиготної делеції у гені *GSTM1* підвищує ризик захворіти на ХП в 1,65 разів.

У більшості робіт зарубіжних авторів не було виявлено асоціації «нульового» генотипу із ризиком розвитку ХП. Однак у дослідженні Bras J. M. et al. (2005), Ahmadi A. et al. (2000) було показано, що у пацієнтів із генотипом + вік появи проявів хвороби був значно вищим (68 років), в той час як пацієнти з генотипом del мали більш ранній вік маніфестації захворювання (57 років). Крім того, встановлено, що «нульовий» генотип гена *GSTM1* є генетичним маркером підвищеного ризику (OR = 1,45; CI = 1,2–2,8) у пацієнтів із Башкортостану (Illarionov S. N., 2007).

Також нами було проведено аналіз поліморфізму $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гену *APOE*.

Генотипування було проведено методом ПДРФ-ПЛР. За результатами генотипування учасників контрольної групи було виявлено наступний розподіл частот генотипів за геном *APOE* — 0,72 ($\epsilon 3/\epsilon 3$), 0,08 ($\epsilon 3/\epsilon 4$), 0,009 ($\epsilon 4/\epsilon 4$), 0,17 ($\epsilon 2/\epsilon 3$), 0,03 ($\epsilon 2/\epsilon 4$) и 0,000 ($\epsilon 2/\epsilon 2$), тобто, найчастіше спостерігався генотип $\epsilon 3/\epsilon 3$, а найнижча частота була в генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$ (табл. 2).

Таблиця 2

Розподіл генотипів за поліморфізмом $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ гена *APOE*

Генотипи	Група пацієнтів з ХП, кількість осіб (частота алеля)	Контрольна група, кількість осіб (частота алеля)
	n = 216	n = 300
$\epsilon 3/\epsilon 3$	137 (0,63)	210 (0,72)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	32 (0,15)	24 (0,08)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	7 (0,03)	3 (0,01)
$\epsilon 2/\epsilon 3$	34 (0,16)	53 (0,18)
$\epsilon 2/\epsilon 4$	6 (0,03)	10 (0,03)
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0 (0,0)	0 (0,0)

У групі пацієнтів з ХП частоти генотипів розподілилися наступним чином — 0,63 ($\epsilon 3/\epsilon 3$), 0,15 ($\epsilon 3/\epsilon 4$), 0,03 ($\epsilon 4/\epsilon 4$), 0,16 ($\epsilon 2/\epsilon 3$), 0,02 ($\epsilon 2/\epsilon 4$) і 0,000 ($\epsilon 2/\epsilon 2$). Частоти алелів в контрольній групі розподілились наступним чином: $\epsilon 3$ — 0,82, $\epsilon 4$ — 0,10 та $\epsilon 2$ — 0,06. Частоти алелів в групі пацієнтів з ХП розподілились наступним чином: $\epsilon 3$ — 0,78, $\epsilon 4$ — 0,12 та $\epsilon 2$ — 0,09.

Виходячи з отриманих частот алелів в групі контролю, для проведення аналізу відповідності розподілу частот отриманих генотипів до очікуваних за законом Харді-Вайнберга було розраховано теоретично очікуване число генотипів. Достовірної різниці між теоретично очікуваними та розрахованими частотами не виявлено ($p > 0,05$).

Виходячи з отриманих частот алелів в групі пацієнтів з ХП, аналіз відповідності розподілу частот фактичних генотипів до очікуваних за законом Харді-Вайнберга в групі пацієнтів з ХП показав достовірну різницю між теоретично очікуваними та розрахованими частотами ($\chi^2 = 16,0148$, $p < 0,05$).

Треба відмітити, що генотип $\epsilon 2/\epsilon 2$ виявився відсутнім як у контрольній, так і в досліджуваній групі. Це можна пояснити низькою частотою алелі $\epsilon 2$ в європейських країнах.

Достовірність різниці у розподілі генотипів перевіряли за допомогою критерію χ^2 ($df = 1$, $P < 0,05$). Було встановлено, що частоти генотипів $\epsilon 3/\epsilon 4$ та $\epsilon 4/\epsilon 4$ є суттєво вищими у групі пацієнтів з ХП, що імовірно вказує на зв'язок рідкісної алелі $\epsilon 4$ із ризиком розвитку ХП.

Показана статистично достовірною різниця частоти генотипів $\epsilon 3/\epsilon 4$ та $\epsilon 4/\epsilon 4$ свідчить про можливу роль даного генотипу та алелі $\epsilon 4$ у розвитку ХП у жителів України.

Показник OR для генотипу $\epsilon 3/\epsilon 4$ склав 2,08 (95 % CI: 1,18–3,65), що свідчить про те, що носійство даного генотипу підвищує ризик захворіти на ХП в 2,08 разів. Для генотипу $\epsilon 4/\epsilon 4$ показник OR становив 3,53 (95 % CI: 0,90–13,86). Показник OR, розрахований для алелі $\epsilon 4$ склав 2,36 (95 % CI: 1,47–3,81). Це свідчить про підвищення ризику захворіти на ХП у 2,36 разів у носіїв даної алелі.

Літературні дані з приводу аналізу зв'язку ХП з геном *APOE* є суперечливими. За деякими даними алель $\epsilon 2$ виступає генетичним фактором підвищеного ризику ХП. У дослідженні, виконаному у Франції, було прогенотиповано 57 пацієнтів із сімейною формою та 46 із спорадичною формою ХП. Частота алелі $\epsilon 4$ виявилась однаковою як у контрольній, так і в досліджуваній групах, в той час, як алель $\epsilon 2$, значно частіше зустрічалася у пацієнтів зі спорадичною формою ХП, ніж в контрольній групі. Інша група дослідників виявила, що у жителів Китаю генотип $\epsilon 2/\epsilon 4$ є генотипом підвищеного ризику розвитку ХП (OR = 12,62). Водночас, аналіз частот алелей та генотипів у даному гені у пацієнтів з ХП з Фінляндії не показав достовірних відмінностей порівняно з групою неврологічно здорових людей.

Також нами було проаналізовано частотний розподіл сполучень генотипів за генами *APOE*, *GSTM1* та *CYP1A1* у пацієнтів з ХП та в контрольній групі. З 30 можливих комбінацій генотипів за досліджуваними генами у пацієнтів з ХП було виявлено 25, а в контрольній групі — 23.

Серед пацієнтів із ХП найчастіше зустрічалась комбінація $\epsilon 3*\epsilon 3/+/AG$, $\epsilon 3*\epsilon 3/del/AG$ та $\epsilon 3*\epsilon 3/+/AA$ (відповідає нормальному генотипу), а серед контрольної групи — комбінації $\epsilon 3*\epsilon 3/+/AA$, $\epsilon 3*\epsilon 3/+/AG$ та $\epsilon 3*\epsilon 3/del/AA$.

Цікаво, що у групі пацієнтів з ХП були наявні сполучення генотипів, які не зустрічалися у контрольній групі. Найбільшою частотою з таких характеризувалася комбінація $\epsilon 4*\epsilon 4/del/AG$, що відповідає гомозиготному носійству алелі $\epsilon 4$ у гені *APOE*, гомозиготній делеції у гені *GSTM1* та гетерозиготній алельній комбінації у гені *CYP1A1*.

На основі даних частот сполучень генотипів за генами *APOE*, *GSTM1* та *CYP1A1* у групах пацієнтів з ХП та в контролі здійснено оцінки бінарної логістичної

регресії, міри асоціації методами χ^2 та за допомогою точного критерію Фішера. Отримані тенденції не досягали статистично значимих величин.

Довжина теломер в клітинах букального епітелію виявилася істотно коротшою у пацієнтів з ХП, ніж у контролі (рис. 1).

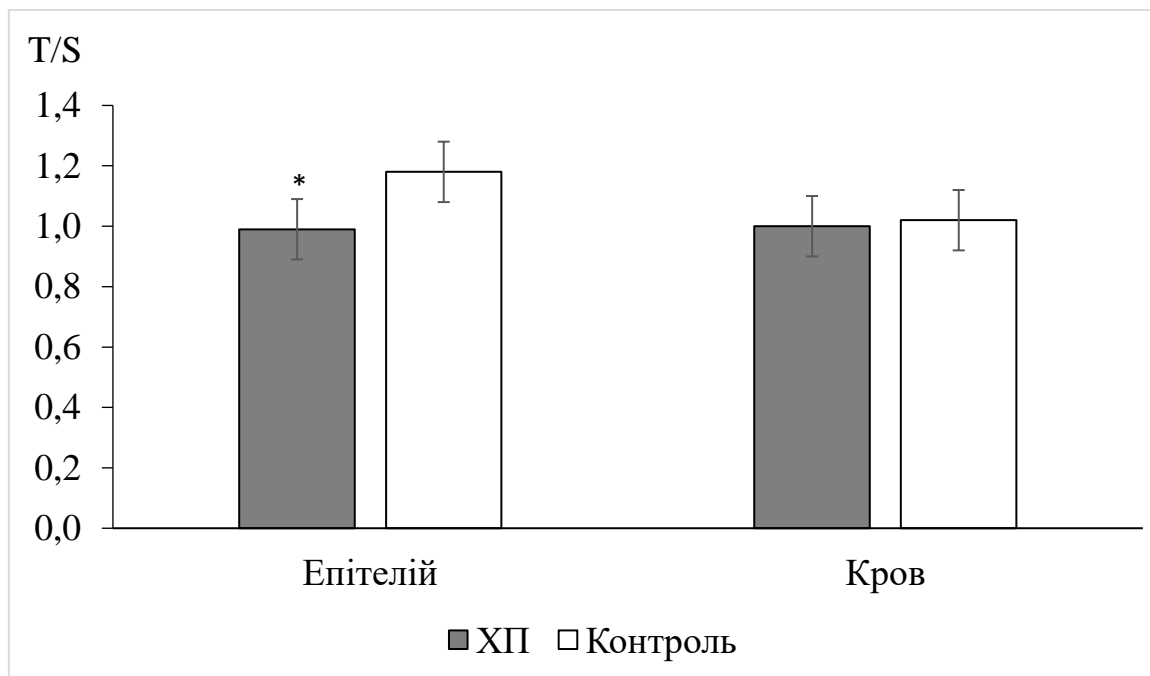


Рис. 1. Відносна довжина теломер (T/S) у пацієнтів з хворобою Паркінсона (ХП) і в контрольній групі

Примітка. * — відмінність відносно групи контролю значима за $p < 0,05$.

Також виявлено статистично значиму кореляцію ($r = 0,55$; $p < 0,01$) між довжинами теломер в клітинах крові і букального епітелію в пацієнтів з ХП, але не в контрольній групі (рис. 2).

Це може свідчити про подібність механізмів ерозії теломер в клітинах різних тканин за нейродегенеративного процесу. Відсутність кореляції між довжинами теломер в клітинах крові і букального епітелію в контрольній групі може бути пов'язана з її гетерогенністю по відношенню до різних «сценаріїв старіння» і, відповідно, різної патологічної навантаженості включених до неї осіб.

У попередніх дослідженнях аналіз асоціації довжини теломери у пацієнтів з ХП приводив до суперечливих даних: за дослідження лейкоцитів периферичної крові у 28 пацієнтів чоловічої статі і 27 осіб контрольної групи короткі теломери (менше 5 000 п. н.) виявлено тільки у пацієнтів з ХП, в той час як середня довжина теломер між двома групами достовірно не розрізнялася. Wang H. і його колеги (2008) в іншому дослідженні не виявили жодної різниці в довжині теломер у 96 пацієнтів з ХП і 172 осіб контрольної групи. Maeda T. зі співавторами (2009) визначили в своєму дослідженні середню довжину теломер, а також статус метилювання субтеломерних регіонів хромосом у 35 пацієнтів з ХП і 42 осіб контрольної групи. Було встановлено,

що лейкоцити пацієнтів з ХП мають підвищений рівень метилювання субтеломерних ділянок, а також більш короткі теломери в порівнянні з контролем. Ці дані підтверджують уже доведений факт про зв'язок метилювання субтеломерних регіонів хромосом з процесом укорочення теломер.

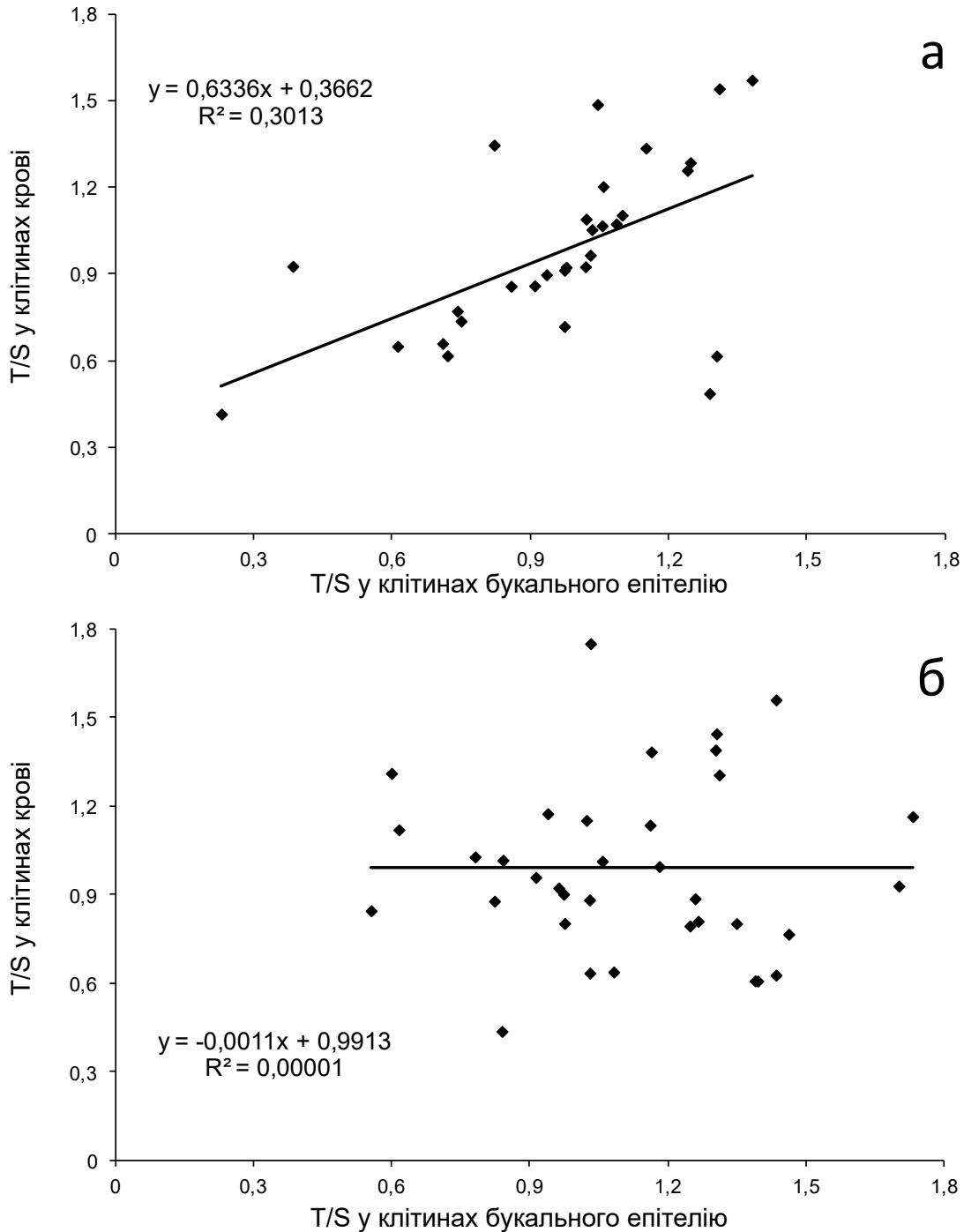


Рис. 2. Кореляція довжини теломер у клітинах крові й букального епітелію у пацієнтів з ХП (а) та в контролі (б)

У нашому дослідженні встановлено значимо меншу довжину теломер в клітинах букального епітелію у пацієнтів з ХП, ніж у контролній групі. Також встановлено кореляцію довжини теломер в клітинах крові з довжиною теломер в клітинах букального епітелію у пацієнтів з ХП. Проте достовірної відмінності у довжині теломер в клітинах крові у пацієнтів з ХП та у здорових осіб групи контролю не встановлено, що можна пояснити гетерогенністю лейкоцитів периферичної крові людини і можливою різноспрямованістю процесів, які відбуваються в них.

Таким чином, довжина теломер в клітинах букального епітелію може стати претендентом на маркер ХП на ранніх етапах захворювання. Для цього потрібні подальші дослідження.

ВИСНОВКИ

У дисертації розв'язано актуальну науково-прикладну задачу в галузі молекулярної генетики, що полягає у визначенні ролі однонуклеотидних замін та поліморфних варіантів генів, пов'язаних із хворобою Паркінсона, а також довжини теломер у клітинах крові й букального епітелію у розвитку хвороби Паркінсона у мешканців України.

1. Мутація с.6055G>A в гені *LRRK2* є фактором генетичної схильності до хвороби Паркінсона та виявлена у 1,86 % пацієнтів з цим захворюванням.

2. Мутації с.1448T>C та с.1226A>G в гені *GBA* є факторами генетичної схильності до хвороби Паркінсона, їх виявлено у 1,86 % та 1,39 % пацієнтів з цим захворюванням відповідно.

3. Носіїв мутації с.209G>A в гені *SNCA* в групі контролю та серед пацієнтів не виявлено.

4. Виявлено асоціацію ризику розвитку хвороби Паркінсона з носійством алельних варіантів гена *CYP1A1*. Наявність алелі с.1384G підвищує ризик у 1,76 (ДІ 95 % 1,30–2,39) разів.

5. Виявлено асоціацію ризику розвитку хвороби Паркінсона з носійством гомозиготної делеції в гені *GSTM*, що підвищує ризик захворювання у 1,65 (ДІ 95 % 1,5–2,37) разів.

6. Виявлено асоціацію ризику розвитку хвороби Паркінсона з носійством алельних варіантів гена *APOE*. Носійство генотипу e3/e4 підвищує ризик у 2,08 (ДІ 95 % 1,18–3,65) разів, генотипу e4/e4 — у 3,53 (ДІ 95% 0,90–13,86) разів.

7. Визначено, що довжина теломер в клітинах букального епітелію є меншою у пацієнтів з хворобою Паркінсона, ніж у здорових осіб і корелює з довжиною теломер в клітинах крові ($r = 0,55$; $p < 0,01$).

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Коляда АК, Соседко АС, Чивликли МА, Вайсерман АМ, Карабань ІН. Мутації генів LRRK2, GBA и SNCA, асоційованих з болєзньо Паркінсона у жителєй України, Пробл. старєния и долголетия, 2015;24(1):14–20. (*Особистий внесок здобувача: проведення генетичного дослідження, розробка нових методів, аналіз та інтерпретація результатів, статистичний аналіз, написання статті*).

2. Коляда АК, Плетнева ТВ, Соседко АС, Чивликлий МА, Вайсерман АМ, Карабань ІН. Генетические факторы риска развития болєзни Паркінсона в Украине, Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. 2015;6(1): 45–50. doi:10.15421/021509. (*Особистий внесок здобувача: планування дизайну та проведення дослідження, аналіз та оформлення результатів, статистичний аналіз, написання статті*).

3. Коляда АК, Вайсерман АМ, Красненков ДС, Плетнева ТВ, Карабань ІН. Изучение молекулярно-генетических маркеров болєзни Паркінсона в Украине, Факторы експериментальної еволюції організмів. 2015;16: 210–215. (*Особистий внесок здобувача: систематизація даних літератури, аналіз та інтерпретація власних результатів, оформлення статті*).

4. Kolyada AK, Vaiserman AM, Krasnenkov DS, Karaban' IN. The study of telomere length in patients with Parkinson disease, Neuroscience and Behavioral Physiology. 2014;114(8): 58–61. doi:/10.1007/s11055-016-0239-4. (*Особистий внесок здобувача: проведення власного дослідження, перевірка та оформлення даних, написання статті*).

5. Коляда ОК, Вайсерман ОМ, Наумчук ДС, Генетичні та біохімічні маркери стану ліпідного обміну при хворобі Паркінсона, Пробл. старєния и долголетия, 2014;23(1): 44–51. (*Особистий внесок здобувача: планування експерименту та проведення дослідження, аналіз літератури, інтерпретація результатів, написання основних положєнь статті*).

6. Коляда ОК, Вайсерман ОМ, Карабань ІМ, Асоціація поліморфізмів генів СYP1A1 та GSTM1 з ризиком розвитку хвороби Паркінсона в українській популяції, Пробл. старєния и долголетия, 2013;22(3): 288–293. (*Особистий внесок здобувача: планування дизайну та проведення власного дослідження, систематизація, аналіз та інтерпретація результатів, написання статті*).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Коляда ОК. Молекулярні маркери хвороби Паркінсона в Україні. Тези доповідєй ІІІ Науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція», Харків, Україна, 19 листопада, 2020:133.

2. Коляда АК, Чивликлий МА, Вайсерман АМ, Карабань ІН. Роль генетических факторов в патогенезе болєзни Паркінсона. Тези VI національного конгрєсу геронтологів і геріатрів України, Київ, Україна, 19–21 жовтня, 2016:74–5.

3. Коляда ОК. До питання про поліморфізм генів GSTM1 та СYP1A1 у пацієнтів з хворобою Паркінсона. Матеріали VIII міжнародної конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфєри», Харків, Україна, 3–6 грудня, 2013:60.

4. Коляда АК, Вайсерман АМ. Мутация G2019S в гене LRRK2 у больных болезнью Паркинсона в украинской популяции. Матеріали Х міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012: біологічні науки», Київ, Україна, 19–23 березня, 2012:158.

5. Коляда АК. Исследование генетического и эпигенетического полиморфизма генов паркинов при болезни Паркинсона. Матеріали VII міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, Україна, 20–23 листопада, 2012:86.

6. Коляда АК. Полиморфизм и метилирование генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона. Тезисы докладов и стендовых сообщений V международной школы молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома», Москва-Звенигород, Россия, 3–7 декабря, 2012:33.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Коляда ОК, Вайсерман ОМ. Спосіб генетичної діагностики хвороби Паркінсона. Патент на корисну модель 86930 UA, МПК (2014.01) G01N 33/0; заявник та патентовласник ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України» (UA). № u201310200 ; заяв. 19.08.2013 ; опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1.

АНОТАЦІЯ

Коляда Олександр Костянтинович. Роль мутацій в генах *LRRK2*, *SNCA* та *GBA* та поліморфних варіантів генів *CYP1A1*, *GSTM1* та *APOE*, й довжини теломер у ризику розвитку хвороби Паркінсона. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 — молекулярна генетика. — Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України». — Київ, 2021.

З метою вивчення ролі мутацій та поліморфних варіантів низки генів, а також довжини теломер у розвитку хвороби Паркінсона проведено проспективне дослідження на базі Державної установи «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова» Національної академії медичних наук за участю 216 пацієнтів з хворобою Паркінсона та 300 здорових осіб групи контролю. Матеріалом дослідження слугували зразки крові та букального епітелію пацієнтів із діагнозом хвороби Паркінсона та клінічно здорових людей. Обстежено 216 пацієнтів із хворобою Паркінсона (106 чоловіків та 110 жінок), середній вік $63,1 \pm 1,3$ (38–78) років, із середньою тривалістю захворювання $7,6 \pm 0,33$ роки. Діагноз хвороби Паркінсона встановлювали відповідно до міжнародних критеріїв. Мутация с.6055G>A в гені *LRRK2* є фактором генетичної схильності до хвороби Паркінсона та виявлена у 1,86 % пацієнтів з цим захворюванням. Мутації с.1448T>C та с.1226A>G в гені *GBA* є факторами генетичної схильності до хвороби Паркінсона, їх виявлено у 1,86 % та 1,39 % пацієнтів з цим захворюванням відповідно. Носіїв

мутації с.209G>A в гені *SNCA* в групі контролю та серед пацієнтів не виявлено. Виявлено асоціацію ризику розвитку хвороби Паркінсона з носійством алельних варіантів гена *CYP1A1*. Наявність алелі с.1384G підвищує ризик у 1,76 (ДІ 95 % 1,30–2,39) разів. Виявлено асоціацію ризику розвитку хвороби Паркінсона з носійством гомозиготної делеції в гені *GSTM1*, що підвищує ризик захворювання у 1,65 (ДІ 95 % 1,5–2,37) разів. Виявлено асоціацію ризику розвитку хвороби Паркінсона з носійством алельних варіантів гена *APOE*. Носійство генотипу $\epsilon 3/\epsilon 4$ підвищує ризик у 2,08 (ДІ 95 % 1,18–3,65) разів, генотипу $\epsilon 4/\epsilon 4$ — у 3,53 (ДІ 95% 0,90–13,86) разів. Визначено, що довжина теломер в клітинах букального епітелію є меншою у пацієнтів з хворобою Паркінсона, ніж у здорових осіб і корелює з довжиною теломер в клітинах крові ($r = 0,55$; $p < 0,01$).

Ключові слова: хвороба Паркінсона, мутації, поліморфізм генів, теломери, молекулярно-генетичне дослідження.

SUMMARY

Koliada Oleksandr Kostiantynovych. The role of mutations in the *LRRK2*, *SNCA* and *GBA* genes and polymorphic variants of the *CYP1A1*, *GSTM1* and *APOE* genes, and telomere length in the risk of Parkinson's disease. —Manuscript.

Dissertation for the candidate degree of Biology in the specialty 03.00.22 — Molecular genetics. —Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

With the objective to investigate the role of mutations and polymorphic variants of a number of genes, as well as telomere length in the development of Parkinson's disease, prospective study was conducted on the basis of the State Institution Dmitry F. Chebotarev Institute of Gerontology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine with the participation of 216 patients with Parkinson's disease and 300 healthy individuals of the control group. The study material was blood samples and buccal epithelium of patients diagnosed with Parkinson's disease and clinically healthy people. We examined 216 patients with Parkinson's disease (106 men and 110 women), mean age 63.1 ± 1.3 (38–78) years, with a mean disease duration of 7.6 ± 0.33 years. The c.6055G> A mutation in the *LRRK2* gene is a factor in the genetic predisposition to Parkinson's disease and is found in 1.86 % of patients with this disease. Mutations c.1448T> C and c.1226A> G in the *GBA* gene are factors of genetic predisposition to Parkinson's disease, they were found in 1.86 % and 1.39 % of patients with this disease, respectively. Carriers of the c.209G> A mutation in the *SNCA* gene were not detected in the control group and among patients. The association of the risk of developing Parkinson's disease with the carrier of allelic variants of the *CYP1A1* gene has been revealed. The presence of the c.1384G allele increases the risk by 1.76 (CI 95 % 1.30–2.39) times. The association of the risk of Parkinson's disease developing with the carrier of a homozygous deletion in the *GSTM1* gene was revealed, which increases the risk of the disease by 1.65 (CI 95 % 1.5–2.37) times. The association of the risk of developing Parkinson's disease with the carrier of allelic variants of the *APOE* gene has

been revealed. Carrier of the e3 / e4 genotype increases the risk by 2.08 (CI 95 % 1.18–3.65) times, e4 / e4 genotype – by 3.53 (CI 95 % 0.90–13.86) times. It was determined that telomere length in buccal epithelial cells is shorter in patients with Parkinson's disease than in healthy individuals and correlates with telomere length in blood cells ($r = 0.55$; $p < 0.01$).

Key words: Parkinson's disease, mutations, gene polymorphism, telomeres, molecular genetic research.