

ВЫРАЖЕННОСТЬ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ И АКТИВНОСТЬ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ СРЕДИ КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЕЙ КУРСКОГО РЕГИОНА

И.Н. Медведев, И.В. Амелина

Курский институт социального образования, ФГБОУ ВПО «Российский государственный социальный университет», Курск

Целью исследования явилось изучение взаимосвязей между уровнем хромосомных aberrаций и транскрипционной активностью ядрышкообразующих районов хромосом на примере коренных жителей Курского региона.

Материалом исследования послужила случайная выборка из 215 жителей Курской области, у которых оценивалась активность ядрышкообразующих районов и уровень хромосомных aberrаций.

Выяснено, что для лиц с высокой транскрипционной активностью ядрышкообразующих районов хромосом характерен наиболее низкий уровень хромосомных aberrаций, который можно объяснить высокой пролиферативной активностью клеток у лиц в этой группе, а также более интенсивным белковым синтезом. Получены подтверждения адаптивного значения хроматидных поломок хромосом, преобладавших в группе со средней активностью ядрышкообразующих районов хромосом (адаптивная норма), что указывает на взаимосвязь функционального Ag-полиморфизма и уровня хромосомных aberrаций у человека.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, ядрышкообразующие районы хромосом, коренные жители, Курская область

При оценке влияния факторов среды на человека большое распространение получили методы с применением культуры лимфоцитов периферической крови, позволяющие оценивать частоту хромосомных aberrаций (ХА) в популяциях, которые подвергаются или, предположительно, подвергались действию неблагоприятных факторов [Бочков с соавт., 2001]. В результате разработки в 1970-е гг. метода селективной окраски серебром хромосом впервые появилась возможность на цитогенетическом уровне изучать транскрипционную активность ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом [Howell, 1977], которые у человека локализируются в коротких плечах (вторичных перетяжках) пяти пар акроцентрических хромосом (13–15 и 21–22 пары).

Известны работы по изучению фенотипического проявления транскрипционной активности ЯОР хромосом при наличии хромосомных аномалий [Ляпунова с соавт., 1998, 2000], имеются некоторые сведения о величине ЯОР отдельных хромосом при действии мутагенных факторов [Дубинина, 1977; Курбатова с соавт., 1984; Бочков с соавт., 2001], но эти сведения не позволяют говорить о вовлеченности ЯОР в процессы спонтан-

ного мутагенеза, выражающиеся через уровень ХА в длительно существующих популяциях.

Целью исследования явилось изучение взаимосвязей между уровнем хромосомных aberrаций и транскрипционной активностью ядрышкообразующих районов хромосом на примере коренных жителей Курского региона.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужила случайная выборка из 215 коренных жителей Поньковского, Октябрьского и Курского районов Курской области, у которых для проведения цитогенетических исследований однократно в утренние часы производилось взятие периферической крови из локтевой вены.

Культивирование крови и приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по общепринятой методике [Дубинина, 1977]. Клетки фиксировали в фиксаторе Карнуа (метанол + уксусная кислота) в соотношении 3:1 в течение трех и более часов. Посадку, культивирование

лимфоцитов крови и приготовление препаратов проводили строго стандартно во всех случаях. После приготовления препараты выдерживали при комнатной температуре для окраски нитратом серебра 7–14 дней.

Для выявления транскрипционно активных ЯОР использовали метод, предложенный W.M. Howell [Howell, 1977]. Количество активных ЯОР определяли с помощью светового микроскопа «Биолам» (увеличение 10490). Число окрашенных ЯОР подсчитывали в каждой анализируемой метафазной пластинке. Активность ЯОР определяли по величине преципитата серебра индивидуальных акроцентрических хромосом. Визуальная оценка этого показателя производилась по 5-балльной системе: балл 0 – окраска отсутствует (данный ЯОР неактивен); балл 1 – слабая окраска (выпавшие зерна серебра, на спутничных нитях, уже ширины хроматиды); балл 2 – средняя окраска (зерна серебра соответствуют ширине хроматиды); балл 3 – интенсивная окраска (зерна серебра превышают по размерам ширину хроматиды); балл 4 – высоко интенсивная окраска (зерна серебра, выпавшие на каждой хроматиде значительно шире ее и слипаются вместе, образуя общий конгломерат).

Для сравнения окрашенных серебром хромосом использовали такой обобщенный показатель, как суммарная интенсивность окраски серебром всех ЯОР хромосом метафазной пластинки. Для этого сумму баллов интенсивности окраски во всех (обычно 20) метафазных пластинках делили на число исследованных метафазных пластинок. Сумма размеров 10AgЯОР характеризует количество активных ЯОР в клетке и служит основой для сравнения индивидуальных геномов по этому признаку (Ag-полиморфизм). В норме 10AgЯОР варьируют от 15 до 23 у.е. [Ляпунова с соавт., 1998, 2000].

Для проведения исследований на мутагенез, хромосомные препараты окрашивали с помощью красителя Романовского-Гимзы на воде в соотношении 1:50, без предварительной обработки. Время окрашивания составляло 10 мин. Учитывались только хорошо окрашенные метафазные пластинки без наложений друг на друга хромосом [Дубинина, 1977; Kelsey et al., 1991].

Готовые препараты изучали под микроскопом, при этом у одного человека наблюдали 100 метафазных пластинок, их заносили в протокол, где указывался тип повреждения хромосомы, ее группа и координаты метафазной пластинки. Уровень ХА выражался в проценте поврежденных клеток к общему числу просмотренных метафаз [Дубинина, 1977, 1996]. Учитывалось количество клеток с ХА, количество ХА (на 100 клеток), количество фрагментов, количество одиночных и парных

фрагментов, величины хромосомных и хроматидных обменов.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программ «Statgraphics 3.0», «Systat 4.0», «Statistika 6.0». Для проверки статистических гипотез использовали параметрические критерии Стьюдента и Фишера.

Результаты исследования

Общая функциональная активность ЯОР хромосом среди коренных жителей Курской области составила 19.46 ± 0.13 у.е. При этом, величина D-ЯОР оказалась 11.68 ± 0.09 у.е., G-ЯОР – 7.78 ± 0.07 у.е.

Анализ размеров ЯОР хромосом группы D показал, что в основном они были представлены хромосомами с активностью ЯОР равной «3», «2» и «1» у.е. при незначительном преобладании D-ЯОР с 1 у.е. ($33.8 \pm 1.32\%$). При анализе размеров ЯОР хромосом группы G выявлено, что они также были представлены в своей массе ЯОР «3», «2» и «1» у.е., но с преобладанием размера 3 у.е. ($42.0 \pm 1.86\%$).

С учетом суммарной активности ЯОР индивидуумы были подразделены на 3 группы: I группа с низким ($15–17.99$ у.е.) количеством 10AgЯОР – 28%; II группа со средним ($18–20.49$ у.е.) – 40%, III группа с высоким количеством 10AgЯОР (> 20.5 у.е.) – 32%.

Уровень ХА у коренных жителей Курской области составил 1.11 ± 0.09 с превалированием одиночных фрагментов (0.56 ± 0.06) (табл. 1).

Таблица 1. Показатели уровня хромосомных aberrаций среди коренных жителей Курской области (n =215)

| Параметры | Среднее значение и ошибка среднего значения (X ± SE) |
|---------------------------------|--|
| Количество клеток с ХА | 1.07 ± 0.08 |
| Количество ХА (на 100 кл.) | 1.11 ± 0.09 |
| Количество фрагментов | 1.22 ± 0.08 |
| Количество обменов | 0.12 ± 0.03 |
| Количество одиночных фрагментов | 0.56 ± 0.06 |
| Количество парных фрагментов | 0.43 ± 0.05 |
| Количество хромосомных обменов | 0.07 ± 0.02 |
| Количество хроматидных обменов | 0.05 ± 0.03 |

Таблица 2. Сравнительный анализ уровня хромосомных aberrаций между группами лиц с различной транскрипционной активностью ядрышкообразующих районов хромосом, n=215

| РГ \ ХА | I, n=63 $X_1 \pm SE$ | II, n=90 $X_2 \pm SE$ | III, n=62 $X_3 \pm SE$ | I-II, t | I-III, T | II-III, t | I-II, F | I-III, F | II-III, F |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------|-------------|--------------|------------|-------------|--------------|
| Клеток с ХА | 0.96±0.12 | 1.2±0.14 | 0.70±0.11 | 2.18 | 3.25 | 6.01 | 2.04 | 1.25 | 2.55 |
| Количество ХА | 1.01±0.12 | 1.25±0.12 | 0.70±0.13 | 2.01 | 3.88 | 6.00 | 1.58 | 1.41 | * |
| Фрагменты | 1.11±0.12 | 1.35±0.12 | 0.84±0.13 | 2.09 | 3.50 | 5.60 | 1.61 | 1.26 | 1.27 |
| Обмены | 0.09±0.03 | 0.10±0.03 | 0.08±0.06 | * | * | * | 1.42 | 3.43 | 2.40 |
| Одиночные фрагменты | 0.49±0.09 | 0.69±0.09 | 0.24±0.08 | 2.22 | 5.02 | 5.03 | 1.54 | * | 1.79 |
| Парные фрагменты | 0.43±0.09 | 0.51±0.07 | 0.22±0.07 | * | 3.5 | 2.91 | * | 2.18 | 1.81 |
| Хромосомные обмены | 0.06±0.02 | 0.07±0.03 | 0.06±0.04 | * | * | * | 1.75 | 2.25 | 1.28 |
| Хроматидные обмены | 0.03±0.02 | 0.04±0.02 | 0.02±0.01 | * | * | * | * | 2.00 | 2.50 |

Примечание. Достоверные значения: $t > 1.98$; $F > 1.25$. I – группа с низким значением 10AgЯОР – 17.23 ± 0.21 ; D-ЯОР – 10.53 ± 0.12 ; G-ЯОР – 6.69 ± 0.18 . II – группа со средним значением 10AgЯОР – 19.22 ± 0.12 ; D-ЯОР – 11.60 ± 0.13 ; G-ЯОР – 7.61 ± 0.12 . III – группа с высоким значением 10AgЯОР – 21.77 ± 0.19 ; D-ЯОР – 13.12 ± 0.19 ; G-ЯОР – 8.55 ± 0.16

Оценка влияния активности ЯОР на ХА была проведена по группам, различающимся по количеству 10AgЯОР (табл. 2). Установлено, что наиболее высокий уровень ХА наблюдался в группе со средним количеством 10AgЯОР, а самый низкий – в группе с максимальным количеством 10AgЯОР. В результате обработки полученных данных с помощью критерия Стьюдента выявлены различия между группами обследуемых с низким и средним количеством 10AgЯОР по количеству клеток с ХА ($t=2.18$), уровню ХА ($t=2.01$), числу фрагментов ($t=2.09$) и количеству одиночных фрагментов ($t=2.22$).

Отличия между группами обследуемых с низким и высоким количеством 10AgЯОР носили достоверный характер по количеству клеток с ХА ($t=3.25$), величине ХА ($t=3.88$), общему уровню фрагментов ($t=3.50$), числу одиночных ($t=5.02$) и парных фрагментов ($t=3.50$). Достоверные различия между группами обследуемых со средним и высоким количеством 10AgЯОР наблюдались по количеству клеток с ХА ($t=6.01$), уровню ХА ($t=6.00$), числу фрагментов ($t=5.60$), количеству одиночных ($t=5.04$) и парных фрагментов ($t=2.91$).

Обработка полученных данных критерием Фишера позволила получить дополнительные сведения (табл. 2). Так, сравнительный анализ рассматриваемых групп, обследуемых с низким и средним количеством 10AgЯОР показал наибольшую гетерогенность выборки по количеству клеток с ХА ($F=2.04$), по величине хромосомных обменов ($F=1.75$), числу фрагментов ($F=1.61$) и уровню ХА ($F=1.58$).

При сравнении групп, обследуемых с низким и высоким количеством 10AgЯОР показана наибольшая гетерогенность выборки по величине парных фрагментов ($F=2.18$) и представленности хроматидных обменов ($F=2.00$), обменов ($F=1.57$) и величине хромосомных обменов ($F=2.25$). При сравнении групп, обследуемых со средним и высоким количеством 10AgЯОР выявлена наибольшая гетерогенность выборки определена по количеству ХА ($F=2.55$), числу обменов ($F=2.40$), уровню хроматидных обменов ($F=2.50$), величине одиночных ($F=1.79$) и парных фрагментов ($F=1.81$).

Таким образом, между активностью ЯОР и величиной образования ХА в клетках человека существует достаточно выраженная связь.

Обсуждение

Проведенные ранее исследования зависимости активности ЯОР от условий обитания показали, что наибольшее количество ЯОР хромосом регистрируется в ходе приспособления к сложным условиям существования. При этом, нарастание активности ЯОР во многом обуславливается снижением гетерохроматина в популяции, вызывающим изменения функциональной активности, в том числе рибосомных генов [Викторов с соавт., 1990].

Считается, что отмечаемое в ходе эволюции уменьшение числа ЯОР в значительной мере связано с понижением энергетических затрат в специализированных клетках живых организмов [Алтухов, 1989]. Увеличение же числа ЯОР можно связать с повышением устойчивости системы клетки к внешним воздействиям, рассматривая его как выход из эволюционного тупика, к которому ведет любая специализация.

В проведенном исследовании выявлены особенности Ag-полиморфизма жителей Курской области, испытывающих изоляцию расстоянием, заключающиеся в преобладании у хромосом группы D – ЯОР размера в 1 у.е., группы G – в 3 у.е. при малом количестве ЯОР с размерами 0 и 4 у.е. Установлено, что при всех вариантах количества 10AgЯОР можно наблюдать различия в уровнях проявления ХА, что можно было расценивать как результат воздействия одинаковых общесредовых факторов, проявляющих в фенотипе индивидуумов различных групп по-разному.

Выяснено, что наиболее высокий уровень ХА наблюдался в группе со средним количеством, а самый низкий – в группе с максимальным количеством 10AgЯОР обследуемых. Были показаны достоверные различия между тремя отличающимися по количеству 10AgЯОР группами коренных жителей Курской области, что вполне объяснимо различной пролиферативной активностью клеток в этих группах. В группе с высоким количеством 10AgЯОР наблюдался минимальный уровень ХА, что может быть объясняться несколькими фактами: более высокой пролиферативной активностью, ведущей к быстрой элиминации ХА; наиболее интенсивным у них белковым синтезом, способным приводить к повышению скорости репаративных процессов (из-за интенсивного синтеза ферментов репарации), а также активацией механизмов перехода неактивных ЯОР в активное состояние под действием неблагоприятных факторов среды, что и ведет к повышению количества 10AgЯОР у индивидов.

Большинством исследователей принята концепция, согласно которой малые дозы фоновой радиации, которые испытывают на себе все живые существа на нашей планете в обычных условиях, приводят к двум группам явлений: 1) адаптивный отклик в основной массе клеток; 2) аутоиндукция хромосомных аномалий, являющейся генетической адаптацией, направленной на образование клеток эволюционного резерва, способствующих в ходе отбора выживанию генетически измененной и адаптированной к новым условиям клеточной популяции [Дубинин с соавт., 1976; Дубинина, 1996]. Одними из таких адаптивных механизмов, возможно, и являются ХА, что находит подтверждение в современной литературе по данной проблеме [Дубинина, 1996].

Рассматривая группу со средним количеством 10AgЯОР как адаптивную норму, представляется вполне логичным, что у них самый высокий уровень ХА, т.е. лучший адаптивный ответ. По мнению ряда авторов он заключается в амплификации некоторых генов, которые могут активизировать транскрипцию генов, кодирующих различные ферменты [Дубинина с соавт., 1990; Бочков с соавт., 2001]. Группа с низким количеством 10AgЯОР занимает промежуточное положение по уровню ХА, что может быть объяснимо, во-первых, менее интенсивной пролиферацией, а, во-вторых, меньшими адаптивными способностями.

Таким образом, существующая взаимосвязь функционального Ag-полиморфизма и уровня хромосомных aberrаций у человека в длительно существующих популяциях имеет глубокую биологическую основу, регулируя процессы адаптации.

Библиография

- Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1989. 328 с.
- Бочков Н.П., Чеботарев А.Н., Катосова Л.Д. База данных для анализа количественных характеристик частоты хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // Генетика, 2001. № 4. С. 549-557.
- Викторов В.В., Егорова Н.А., Ляпунова Н.А. Сравнение Ag-вариантов ядрышкообразующих хромосом человека в популяциях Москвы и Забайкалья // Второй всесоюзный съезд медицинских генетиков: Тез. док. М., 1990. С. 77-78.
- Дубинин Н.П., Алтухов Ю.П., Курбатова О.Л. Интегральная генетическая характеристика «адаптивной нормы» в популяции человека // Доклады АН СССР, 1976. № 4. С. 957-960.
- Дубинина Л.Г. Лейкоциты крови человека – тест-система для оценки мутагенов среды. М.: Наука, 1977. 152 с.

- Дубинина Л.Г. Структурные aberrации хромосом, индуцированные γ -излучением, и кросс-адаптация у *Speris capillaries* // Генетика, 1996. № 3. С. 373–378.
- Дубинина Л.Г., Курашова З.И., Волкова И.В. Малые дозы ионизирующих излучений и индуцибельная система репарации // Доклады АН СССР, 1990. Т. 311. № 2. С. 481–484.
- Курбатова О.Л., Ботвиньев О.К., Алтухов Ю.П. Популяционно-генетический подход к проблеме неспецифической биологической устойчивости человеческого организма. Сообщение III. Группы крови систем АВО и Resus у здоровых и больных детей и их матерей // Генетика, 1984. № 4. С. 691–670.
- Ляпунова Н.А., Егорова Н.А., Цветкова Т.Г. Рибосомные гены в геноме человека: вклад в генетическую индивидуальность и фенотипическое проявление дозы гена // Вестник Российской академии медицинских наук, 2000. № 5. С. 19–23.
- Ляпунова Н.А., Кравец-Мандрон И.А., Цветкова Т.Г. Цитогенетика ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом человека: выделение четырех морфофункциональных вариантов ЯОР, их межиндивидуальное и межхромосомное распределение // Генетика, 1998. № 9. С. 1298–1306.
- Howell W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes // Chromosome, 1977. Vol. 62 (4). P. 60–61.
- Kelsey K., Memisoglu A., Frenkel D. Human lymphocytes exposed to low doses of X-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis // Mutat. Res., 1991. Vol. 263 (4). P. 197–201.

Контактная информация:

Медведев Илья Николаевич: e-mail: zsyu@046.ru;

Амелина Ирина Валерьевна: e-mail: zsyu@046.ru

THE SEVERITY OF CHROMOSOME ABERRATIONS AND THE ACTIVITY AREAS OF NUCLEUS ORGANIZING CHROMOSOMES AMONG INDIGENOUS PEOPLE IN THE KURSK REGION

I.N. Medvedev, I. V. Amelina

The Kursk Institute of Social Education (branch) of the Russian State Social University, Kursk

The aim of the study was to examine the relationship between the level of chromosome aberrations and transcription activity nucleus organizing areas of chromosomes on the example of the indigenous inhabitants of Kursk region.

Material of the research served as a random sample of 215 residents of Kursk region, assessing the activity nucleus organizing areas and level of chromosome aberrations.

Found that people with high transcription activity nucleus organizing areas of chromosomes characteristic of most low level of chromosome aberrations, which may explain the high proliferative activity of cells in individuals in this group, as well as more intense protein synthesis. Received confirmation of the Adaptive value of chromatid breakage of chromosomes, which prevailed in the group with high activity nucleus organizing areas of chromosomes (adaptive rate), indicating a functional relationship Ag-polymorphism and level of chromosome aberrations in human.

Keywords: *chromosomal aberrations, nucleus organizing regions of chromosomes, the indigenous, the Kursk region*