
ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПРОЯВЛЕННОСТЬ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ АКТИВНОСТИ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ В ПОПУЛЯЦИИ КОРЕННЫХ ЖИТЕЛЕЙ КУРСКОГО РЕГИОНА

И.В. Амелина

Курский институт социального образования (филиал) РГСУ
ул. К. Маркса, 51, Курск, Россия, 305029

В популяции коренных жителей Курской области активность ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом составляет $19,46 \pm 0,13$ у.е., D-ЯОР — $11,68 \pm 0,09$ у.е., G-ЯОР — $7,78 \pm 0,07$ у.е. при небольшой представленности ЯОР с размерами 0 и 4 у.е. Установлена связь активности ЯОР хромосом с интенсивностью структурных белков в популяции, испытывающей изоляцию расстоянием. Наибольшие фенотипические различия активности ядрышкообразующих районов были отмечены в количественном содержании белков спектринов и белка полосы 6.

Ключевые слова: ядрышкообразующие районы хромосом, Ag-полиморфизм, белки мембран эритроцитов, Курский регион, изоляция расстоянием.

Известно, что ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом у человека, локализующиеся в коротких плечах (вторичных перетяжках) пяти пар акроцентрических хромосом (13—15 и 21—22 пары хромосом), содержат в себе рибосомные гены (РГ), располагающиеся у человека тандемно [4]. С разработкой в 1970-е гг. XX в. метода селективной окраски серебром ЯОР хромосом впервые появилась возможность на цитологическом уровне изучать транскрипционную активность этих генов [8], открыв новый тип полиморфизма хромосом человека — Ag-полиморфизм, ставший предметом активного изучения. Было предложено суммарный размер AgЯОР десяти акроцентрических хромосом (10AgЯОР), выраженный в условных единицах (у.е.), рассматривать как критерий активности ЯОР [6].

Имеются сведения по изучению популяционного Ag-полиморфизма, и встречается мало работ по изучению активности ЯОР в условиях изоляции расстоянием, под которым понимается заключение браков между жителями одного региона в радиусе 30 км на протяжении не менее трех поколений. Также в литературе не получила должного освещения проблема фенотипического проявления ЯОР и значимости функционального Ag-полиморфизма хромосом в количественной представительности белков в организме. Наиболее перспективным является изучение структурных белков, не зависящих от функционального состояния организма, к которым относятся белки мембран эритроцитов (БМЭ). В этой связи сформулирована цель исследования — изучить транскрипционную активность ЯОР в условиях изоляции расстоянием в Курском регионе и ее влияние на количество БМЭ.

Материалы и методы исследования. Выборка для исследования была составлена случайно и состояла из 215 жителей Поньковского, Курского, Октябрьского районов Курской области, проживающих в условиях изоляции расстоянием. Материалом исследования для цитогенетических и биохимических методов послужила их периферическая кровь.

Культивирование лимфоцитов периферической крови и приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по общепринятой методике [1]. В работе использовать: гепарин фирмы Richter (Венгрия), фитогемагглютинин фирмы Difko-P (США), среда 199, сыворотка крупного рогатого скота, колхицин, хлорид калия, метанол, ледяная уксусная кислота, серная кислота концентрированная, дихромат калия, нитрат серебра, раствор желатина, цитрат натрия, хлорид натрия, гидроортофосфат натрия, дигидроортофосфат калия, краситель Гимза фирмы Merck (США).

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. С целью выявления транскрипционно активных ядрышкообразующих районов использовали метод, предложенный W.M. Howell [8].

Оценка активности ЯОР проводилась с помощью светового микроскопа «Биолам» (увеличение 10×90). Число окрашенных ЯОР подсчитывали в каждой анализируемой метафазной пластинке.

Активность ЯОР определяли при визуальной оценке величины преципитата серебра индивидуальных акроцентрических хромосом по 5-балльной системе: от 0 (окраска отсутствует — ЯОР неактивен) до 4 у.е. [2; 6].

Сумма размеров 10AgЯОР , характеризующая количество активных ЯОР в клетке, служила основой для сравнения индивидуальных геномов по этому признаку (Ag -полиморфизм). В норме количество 10AgЯОР варьирует от 15 до 23 у.е.

Выделение эритроцитов велось из гепаринизированной крови. Из полученной очищенной массы эритроцитов выделяли мембраны с помощью одномерного электрофореза по Лэмли на пластинах с полиакриламидным гелем, которые затем окрашивали красителем Кумасси (R-250 по методу Fairbanks в растворе: 10% уксусная кислота, 25% изопропанол, 0,05% кумасси R-250) [7]. На электрофореграммах идентифицировали 16 белковых фракций. Денситометрирование электрофореграмм проводили на лазерном денситометре Ultrascan XL. В ходе работы использовались следующие реактивы: декстран Т-500 фирмы Sigma (США), HBS-целлюлоза фирмы Sigma (США), гидрофосфат натрия, хлористый натрий, мочевины фирмы Bio-Rad (США), трис-2-меркаптоэтанол, персульфат аммония Reanal (Венгрия), додецил сульфат натрия (ДСН) фирмы Диа-Фарм (Россия), акриламид Sigma (США), метилен бисакриламид Fluka (Швейцария), кумасси G-200 фирмы Serva (ФРГ), бромфеноловый синий, глицин, набор белков для определения молекулярного веса MS-2 (Россия). Реактивы отечественного производства были марки ХЧ и ОСЧ.

Статистическая обработка материала проведена с использованием критерия Стьюдента [3].

Результаты исследования. Активность ЯОР хромосом среди коренных жителей Курской области составила $19,46 \pm 0,13$ у.е. При этом величина D-ЯОР у них оказалась $11,68 \pm 0,09$ у.е., а G-ЯОР — $7,78 \pm 0,07$ у.е. Анализ размеров ЯОР хромосом группы D у обследованных показал, что незначительно преобладали D-ЯОР с 1 у.е. ($33,8 \pm 1,32\%$). В размерах ЯОР хромосом группы G преобладали G-ЯОР

с 3 у.е. ($42,0 \pm 1,86\%$). При анализе 10AgЯОР выявлено также преобладание ЯОР с 3 у.е. ($35,4 \pm 1,08\%$), при низкой представленности ЯОР с 0 и 4 у.е. В ходе исследования все индивидуумы по суммарной активности ЯОР были подразделены на группы с низким (15—17,99 у.е.) средним (18—20,49 у.е.) и высоким количеством 10AgЯОР ($> 20,5$ у.е.). Первая группа представлена 29,3% обследованных при значениях 10AgЯОР составивших $17,26 \pm 0,11$ у.е., D-ЯОР — $10,47 \pm 0,09$ у.е.; G-ЯОР — $6,81 \pm 0,08$ у.е.; во второй группе (41,4%) 10AgЯОР составили $19,36 \pm 0,07$ у.е., D-ЯОР — $11,59 \pm 0,08$ у.е.; G-ЯОР — $7,74 \pm 0,07$ у.е.; в третьей группе (29,3%) индивидуумы имели следующие средние значения: 10AgЯОР — $21,70 \pm 0,12$ у.е., D-ЯОР — $13,09 \pm 0,11$ у.е.; G-ЯОР — $8,61 \pm 0,11$ у.е. Распределение в анализируемой выборке показателей активности ЯОР представлены в табл. 1.

Таблица 1

Активность ядрышкообразующих районов у коренных жителей Курской области, $n = 215$

ЯОР, у.е.	Кол-во человек	D-ЯОР, у.е.	Кол-во человек	G-ЯОР, у.е.	Кол-во человек
15,6—15,9	2	9,3—9,9	8	5,41—5,99	2
16—16,99	14	10—10,9	44	6—6,99	39
17—17,99	19	11—11,9	68	7—7,99	72
18—18,99	46	12—12,9	48	8—8,99	62
19—19,99	44	13—13,9	41	9—9,99	37
20—20,99	42	14—14,7	6	10—10,62	3
21—21,99	27				
22—22,99	12				
23—23,52	9				

Количество БМЭ обследованных приведено в табл. 2. Установлено, что наиболее представительными в клеточных мембранах оказались фракции α - и β -спектринов, белков полос (БП) 3 и БП 4,5 (глюкозный транспортер), которые при этом оказались и наиболее гетерогенными.

Таблица 2

Сравнительный анализ количественных показателей белков мембран эритроцитов между группами лиц с различной транскрипционной активностью ядрышкообразующих районов хромосом, $n = 215$

Белки, мг/10 ¹² эр.	Группы с различным количеством 10AgЯОР ($\bar{X} \pm SE$)			Содержание белков в среднем для всех трех групп мг/10 ¹² эр.
	I $n = 63$	II $n = 89$	III $n = 63$	
α -спектрин	$113,65 \pm 4,1^{**}$	$123,36 \pm 3,14^{**}$	$125,39 \pm 4,4$	$120,8 \pm 3,88$
β -спектрин	$137,61 \pm 1,9^{**}$	$143,32 \pm 2,61^{**}$	$149,9 \pm 3,36^*$	$143,61 \pm 2,62$
2.1-анкирин	$25,18 \pm 2,29$	$24,68 \pm 1,37^{**}$	$31,3 \pm 1,66^{**}$	$27,05 \pm 1,77$
2.2-анкирин	$13,74 \pm 1,05$	$13,24 \pm 0,84^*$	$16,23 \pm 1,1^{**}$	$14,40 \pm 1,00$
2.3-анкирин	$14,98 \pm 0,89$	$15,94 \pm 0,81$	$16,27 \pm 0,79$	$15,73 \pm 0,83$
Б.п.3	$224,66 \pm 3,6^*$	$231,99 \pm 2,85$	$227,9 \pm 3,87$	$228,18 \pm 3,44$
Б.п.4.1	$41,89 \pm 1,34$	$42,24 \pm 1,02$	$42,24 \pm 1,02$	$42,12 \pm 1,13$
Б.п.4.2	$55,63 \pm 1,36$	$56,58 \pm 1,01$	$57,4 \pm 1,01$	$56,54 \pm 1,13$
Б.п.4.5	$111,76 \pm 3,7$	$111,81 \pm 2,17$	$117,28 \pm 4,3$	$113,62 \pm 3,39$
Б.п. 4.9	$28,44 \pm 1,2^*$	$31,28 \pm 1,17^*$	$31,5 \pm 1,52$	$30,41 \pm 1,30$
Б.п. 5	$59,81 \pm 2,37$	$58,83 \pm 1,41$	$59,39 \pm 2,01$	$59,34 \pm 1,93$
Б.п. 6	$19,58 \pm 1,36^{**}$	$23,93 \pm 1,01^{**}$	$26,1 \pm 1,33^*$	$23,20 \pm 1,23$
Б.п. 7	$84,31 \pm 3,78$	$87,70 \pm 3,02^*$	$91,98 \pm 4,02$	$88,00 \pm 3,61$
Б.п. 8	$30,90 \pm 1,94$	$30,99 \pm 1,39$	$29,62 \pm 1,67$	$30,50 \pm 1,67$
Гемоглобин	$15,87 \pm 1,26^{**}$	$19,13 \pm 1,14$	$17,91 \pm 1,26$	$17,64 \pm 1,22$
Общий белок	$818,2 \pm 12,2$	$818,28 \pm 11,4^*$	$841,7 \pm 12,8^{**}$	$826,06 \pm 12,13$

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$; группа I — с низким количеством 10AgЯОР — $17,26 \pm 0,11$; группа II — со средним количеством — 10AgЯОР — $19,36 \pm 0,06$; группа III — с высоким количеством 10AgЯОР — $21,70 \pm 0,12$.

Установлено, что с повышением транскрипционной активности ЯОР незначительно увеличивается количественная представительность всех исследуемых белков мембран эритроцитов. В большинстве случаев эти различия носили достоверный характер. Наиболее выраженными оказались различия по белкам спектринам и БП6, что, видимо, объясняется влиянием активных ЯОР на их количественную представительность.

Сравнительный анализ групп обследуемых с низким и средним количеством 10AgЯОР выявил достоверно значимые различия по белкам полос: α -спектрину ($p < 0,01$), β -спектрину ($p < 0,01$), БП 3 ($p < 0,01$), БП 4,9 ($p < 0,05$), БП 6 ($p < 0,01$) и гемоглобину ($p < 0,01$). Между группами со средним и высоким количеством 10AgЯОР найдены достоверные различия по следующим фракциям белков: β -спектрину ($p < 0,05$), 2,1-анкирину ($p < 0,01$), 2,2-анкирину ($p < 0,01$), БП 6 ($p < 0,05$) и общему белку ($p < 0,01$). Наиболее выраженные различия были установлены между группами с низким и высоким количеством 10AgЯОР: α -спектрину ($p < 0,01$), β -спектрину ($p < 0,01$), 2,1-анкирину ($p < 0,01$), 2,2-анкирину ($p < 0,05$), БП 4,9 ($p < 0,05$), БП 6 ($p < 0,01$), БП 7 ($p < 0,05$) и по общему белку ($p < 0,05$).

Обсуждение. Полученные популяционные характеристики Ag-полиморфизма среди коренных жителей Курской области оказались сопоставимы со средними значениями по России. У жителей Курской области в условиях изоляции расстоянием отмечены некоторые особенности Ag-полиморфизма, заключающиеся в преобладании у хромосом группы D-ЯОР с 1 у.е., а у хромосом группы G — с 3 у.е., на фоне малого количества ЯОР размерами 0 и 4 у.е. Выявленные закономерности транскрипционной активности ЯОР хромосом были во многом связаны с условиями изоляции расстоянием. Так, незначительное количество AgЯОР с 0 у.е. может появляться в популяции вследствие наследования в поколениях вариантов AgЯОР каждой акроцентрической хромосомы как независимых менделирующих признаков. Кроме того, при изоляции расстоянием происходит разделение популяции на доминантные и рецессивные аллели. Ввиду существования некоторого порогового значения 10AgЯОР (ниже которого происходит элиминация зиготы на ранних этапах дробления) происходит выживание особей, содержащих доминантные аллели. Это ведет к повышению количества активных ЯОР у индивидуумов при лишь незначительном присутствии акроцентрических хромосом, не имеющих серебрищихся районов. Накопление же ЯОР с крупными Ag-блоками (4 у.е.) может происходить при крайне неблагоприятных условиях среды [4]. Этим объясняется, что в популяции Курской области, проживающей на относительно благополучной с экологической точки зрения территории, ЯОР с 4 у.е. присутствуют в очень небольшом количестве.

В популяции, испытывающей изоляцию расстоянием, существует склонность к увеличению количественной представительности структурных белков мембран эритроцитов при повышении транскрипционной активности ЯОР. Найденное достоверное увеличение количественной представительности основных БМЭ в популяции коренных жителей региона можно расценивать как один из адаптационных механизмов, включающихся в условиях изоляции расстоянием.

Таким образом, в популяции коренных жителей Курской области отмечается средний уровень активности ЯОР хромосом, оказывающей значимое фенотипическое влияние на количественную представленность структурных белков мембран эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Залетаева Т.А., Кулешов Н.П., Залетаев Д.В. и др.* Современные методы хромосомного анализа в клинико-цитогенетических исследованиях: Российская мед. акад. последип. образ. — М.: Медицина, 1994.
- [2] *Карлова Е.М., Аброян Л.О., Акопян Л.О. и др.* Поведение ядер и ядрышкообразующих районов хромосом лимфоцитов на разных стадиях развития периодической болезни // *Цитология*. — 2004. — Т. 46, № 4. — С. 376—380.
- [3] *Лакин Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990.
- [4] *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.
- [5] *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.
- [6] *Павлов А.Ю.* Регуляция эритропоэза: Физиологические и клинические аспекты. — М.: Медицина, 1987.
- [7] *Blum H., Beir H., Cross H.* Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels // *Electrophoresis*. — 1987. — V. 8. — P. 126—129.
- [8] *Howell W.M.* Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes // *Chromosome*. — 1977. — V. 62, № 4. — P. 60—61.

FENOTIPICHESKY SURVIVAL AT CELLULAR LEVEL OF ACTIVITY OF AREAS NUCLEUS ORGANIZING REGIONS OF ABORIGINALS OF KURSK REGION

I.V. Amelina

Kursk Institute of Social Education (branch)
Russian State Social University
K. Marx str., 51, Kursk, Russia, 305029

Activity nucleus organizing regions in Kursk area has made $19,46 \pm 0,13$ c.u., D-ЯОР — $11,68 \pm 0,09$ y.e., G-ЯОР — $7,78 \pm 0,07$ y.e., thus in surveyed population small amount ЯОР with the sizes 0 and 4 c.u. is registered. Besides, activity communication nucleus organizing regions with intensity of synthesis of proteins of membranes erythrocyte at inhabitants of Kursk area has been investigated.

The greatest phenotypic the effect of activity nucleus organizing regions was showed in the quantitative maintenance of proteins spectrin and the squirrel of a strip 6.

Key words: nucleus organizing regions, Ag-polymorphism, squirrels of membranes erythrocyte, Kursk region, isolation in distance.