
УРОВЕНЬ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ И АКТИВНОСТЬ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ ХРОСОМ В КУРСКОМ РЕГИОНЕ

И.Н. Медведев, И.В. Амелина

Курский институт социального образования (филиал) РГСУ
ул. К. Маркса, 53, Курск, Россия

Исследовано фенотипическое проявление уровня хромосомных aberrаций и транскрипционной активности ядрышкообразующих районов хромосом на примере развития артериальной гипертензии. Доказано влияние активности ядрышкообразующих районов хромосом и образование хромосомных aberrаций на развитие артериальной гипертензии у человека. Подтверждены сведения об адаптивном значении хроматидных поломок хромосом, задерживающих развитие артериальной гипертензии. Установлена взаимосвязь функционального Ag-полиморфизма и уровня хромосомных aberrаций у человека с развитием артериальной гипертензии, при этом между этими признаками отсутствуют линейные зависимости.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, ядрышкообразующие районы хромосом, Курский регион, Ag-полиморфизм, артериальная гипертензия.

В настоящее время при оценке последствий действия неблагоприятных факторов среды на человека наибольшее практическое распространение получили методы с применением культуры лимфоцитов периферической крови, рекомендованные ВОЗ [12]. Использование этого теста дает важную информацию при оценке частоты хромосомных aberrаций (ХА) в популяциях, которые подвергаются или предположительно подвергались действию неблагоприятных факторов [1; 2].

В литературе встречаются работы по изучению фенотипического проявления транскрипционной активности ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом при хромосомных аномалиях [8; 16], имеются некоторые сведения о величине ЯОР отдельных хромосом при действии мутагенных факторов [1], но эти сведения не позволяют говорить о вовлеченности ЯОР в процессы спонтанного мутагенеза, выражающиеся через уровень ХА [2; 8].

ЯОР хромосом у человека локализируются в коротких плечах (вторичных перетяжках) пяти пар акроцентрических хромосом (13—15 и 21—22). С разработкой в 1970-е гг. метода селективной окраски серебром хромосом впервые появилась возможность на цитогенетическом уровне изучать транскрипционную активность ЯОР хромосом [14]. Однако, несмотря на это, в литературе не получила должного освещения проблема фенотипического спонтанного мутагенеза и проявления ЯОР через развитие артериальной гипертензии (АГ) в популяции.

Целью исследования явилось изучение закономерности фенотипического проявления уровня хромосомных aberrаций и транскрипционной активности ядрышкообразующих районов хромосом на примере развития артериальной гипертензии.

Методика исследования. Материалом исследования послужила случайная выборка из 241 жителя Курской области: Поныровского, Октябрьского и Курского районов. Материалом исследования для цитогенетических методов послужила периферическая кровь, которую забирали из локтевой вены.

Культивирование крови и приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по общепринятой методике [2; 4; 12]. Клетки фиксировали в фиксаторе Карнуа (метанол + уксусная кислота) в соотношении 3 : 1 в течение 3 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 описанный в литературе метод [14]. Количество активных ЯОР определяли с помощью светового микроскопа «Биолам» (увеличение 10×90). 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: 0 баллов — окраска отсутствует, данный ЯОР неактивен; 1 балл — слабая окраска (выпавшие зерна серебра, на спутничных нитях, уже ширины хроматиды); 2 балла — средняя окраска (зерна серебра соответствуют ширине хроматиды); 3 балла — интенсивная окраска (зерна серебра превышают по размерам ширину хроматиды); 4 балла — высокоинтенсивная окраска (зерна серебра, выпавшие на каждой хроматиде, значительно шире нее и слипаются, 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 10 AgЯОР характеризует количество активных ЯОР в клетке и служит основой для сравнения индивидуальных геномов по этому признаку (Ag-полиморфизм). В норме 10 AgЯОР варьируют от 15 до 23 у.е. [10—11].

Для проведения исследований на мутагенез хромосомные препараты окрашивали с помощью красителя Романовского—Гимзы на воде в соотношении 1 : 50 без предварительной обработки. Время окрашивания обычно 10 мин. Метафазные пластинки должны быть хорошо окрашены, без наложений друг на друга хромосом [2; 4; 13].

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 [2; 4; 13].

Статистическая обработка материала проведена на ПЭВМ IBM PC/AT (486) с использованием программы GEN 1 [13] и пакета прикладных программ. Про-

верка нормальности распределения проводилась с использованием программ Statgraphics 3.0 и Systat 4.0, Statistika 6.0.

Для проверки статистических гипотез использовали параметрические критерии Стьюдента и Фишера. Уровень значимости принимали равный 0,05 [7]. В данном исследовании использованы методы многомерной статистики: дискриминантный, регрессионный [9].

Результаты исследования. Нами была проведена оценка уровня ХА и активности ЯОР среди 241 жителя Курской области. В качестве фенотипического признака рассматривалась частота развития АГ среди обследованных. В выборке оценивалось количество клеток с ХА, количество ХА (на 100 клеток), количество фрагментов, одиночных и парных фрагментов, хромосомных и хроматидных обменов (табл. 1).

Таблица 1

Показатели уровня хромосомных aberrаций среди жителей Курской области, N = 241

Параметр	Среднее значение и ошибка среднего значения ($\bar{X} \pm SE$)
Количество клеток с ХА	$1,07 \pm 0,08$
Количество ХА (на 100 кл.)	$1,11 \pm 0,09$
Количество фрагментов	$1,22 \pm 0,08$
Количество обменов	$0,12 \pm 0,03$
Количество одиночных фрагментов	$0,56 \pm 0,06$
Количество парных фрагментов	$0,43 \pm 0,05$
Количество хромосомных обменов	$0,07 \pm 0,02$
Количество хроматидных обменов	$0,05 \pm 0,03$

Общий уровень ХА жителей Курской области составил $1,11 \pm 0,09$. Проводимые ранее исследования в г. Курске показали, что контрольный уровень ХА составил $0,97 \pm 0,15$ [7]. В настоящей выборке превалировали одиночные фрагменты ($0,56 \pm 0,06$) и парные фрагменты ($0,43 \pm 0,05$), тогда как в проводимом ранее исследовании — одиночные фрагменты составили $0,75 \pm 0,13$, а парные $0,18 \pm 0,06$ [7].

С целью изучения проявления активности ЯОР на клеточном уровне был проведен сравнительный анализ различных по количеству 10 АгЯОР групп среди жителей Курской области. Его результаты представлены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что самый высокий уровень ХА наблюдался в группе со средним количеством 10 АгЯОР, а самый низкий — в группе с высоким количеством 10 АгЯОР. При всех вариантах количества 10 АгЯОР можно наблюдать различный уровень проявления ХА, т.е. воздействия общесредовых факторов, который проявляется в фенотипе индивидов различных групп по-разному. Так, различия между группами обследуемых с низким и средним количеством 10 АгЯОР наблюдались по количеству клеток с ХА ($t = 2,18$), количеству ХА ($t = 2,01$), фрагментов ($t = 2,09$) и одиночных фрагментов ($t = 2,22$).

Различия между группами обследуемых с низким и высоким количеством 10 АгЯОР носили достоверный характер по количеству: клеток с ХА ($t = 3,25$), ХА ($t = 3,88$), фрагментов ($t = 3,50$), одиночных ($5,02$) и парных фрагментов ($t =$

= 3,50). Достоверные различия между группами обследуемых со средним и высоким количеством 10 AgЯОР наблюдались по количеству клеток с ХА ($t = 6,01$), ХА ($t = 6,0$), фрагментов ($t = 5,60$), одиночных фрагментов ($t = 5,04$) и парных фрагментов ($t = 2,91$). Нам не удалось выявить различий по хромосомным и хроматидным обменов из-за малой выявляемости последних.

Сравнительный анализ дисперсий рассматриваемых групп обследуемых с низким и средним количеством 10 AgЯОР показал наибольшую гетерогенность второй группы по количеству: клеток с ХА ($F = 2,04$), ХА ($F = 1,58$), фрагментов ($F = 1,61$), обменов ($F = 1,42$), одиночных фрагментов ($F = 1,54$), а в группе с низким количеством 10 AgЯОР — хромосомных обменов ($F = 1,75$).

Сравнение дисперсий между группами обследуемых с низким и высоким количеством 10 AgЯОР показало наибольшую гетерогенность первой группы по количеству клеток с ХА ($F = 1,25$), парных фрагментов ($F = 2,18$) и хроматидных обменов ($F = 2,0$), а у высококопийных — по количеству ХА ($F = 1,41$), фрагментов ($F = 1,25$), обменов ($F = 1,57$) и хромосомных обменов ($F = 2,25$). При сравнении дисперсий между группами обследуемых со средним и высоким количеством 10 AgЯОР выявлена наибольшая гетерогенность первой группы по количеству ХА ($F = 2,25$), фрагментов ($F = 1,27$), одиночных ($F = 1,79$) и парных фрагментов ($F = 1,81$), а в группе с высоким 10 AgЯОР — по количеству хромосомных обменов ($F = 1,28$) (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительный анализ уровня хромосомных aberrаций между группами лиц с различным различной транскрипционной активностью ядрышкообразующих районов хромосом, $N = 213$

ХА	РГ								
	I, $n = 63$ $\bar{X}_1 \pm SE$	II, $n = 90$ $\bar{X}_2 \pm SE$	III, $n = 60$ $\bar{X}_3 \pm SE$	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
К-во 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
Хромосом. обмены	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,04	—	—	—	1,75	2,25	1,28
Хроматидн. обмены	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	—	—	—	—	2,00	2,50

Достоверные значения: $t > 1,98$; $F > 1,25$

I — группа с низким значением 10 AgЯОР — 17,23 ± 0,21; D-ЯОР — 10,53 ± 0,12; G-ЯОР — 6,69 ± 0,18;

II — группа со средним значением 10 AgЯОР — 19,22 ± 0,12; D-ЯОР — 11,60 ± 0,13; G-ЯОР — 7,61 ± 0,12;

III — группа с высоким значением 10 AgЯОР — 21,77 ± 0,19; D-ЯОР — 13,12 ± 0,19; G-ЯОР — 8,55 ± 0,16

Для изучения проявления активности ЯОР на клеточном уровне через образование ХА был проведен сравнительный анализ различных по количеству 10 AgЯОР групп среди жителей Курской области. У индивидуумов с разным количеством 10 AgЯОР можно было ожидать различный уровень образования ХА, т.е. последствия общесредовых факторов. С этой целью была проведена оценка уровня ХА в зависимости от активности ЯОР среди 215 жителей Курской области.

Общий уровень ХА жителей Курской области составил $1,11 \pm 0,09$, что не противоречило проведенным нами ранее исследованиям, контрольный уровень ХА в г. Курске составил $0,97 \pm 0,15$ [7]. В исследуемой выборке преобладали одиночные фрагменты ($0,56 \pm 0,06$) и парные фрагменты ($0,43 \pm 0,05$).

Для оценки зависимости частоты развития АГ от выраженности ХА и активности 10 АгЯОР нами был проведен регрессионный анализ. Составленные уравнения регрессии показали, что зависимость наблюдалась между частотой возникновения АГ и почти всеми показателями ХА, кроме хромосомных и хроматидных обменов, однако она не достигала достоверного уровня значимости почти по всем показателям ХА и степени АкЯОР.

Обсуждение. При анализе стандартных статистик установлено, что самый высокий уровень ХА наблюдался в группе со средним количеством, а самый низкий — в группе с высоким количеством 10 АгЯОР обследуемых. Нами были показаны достоверные различия между тремя различными по количеству 10 АгЯОР группами, что вполне объяснимо различной пролиферативной активностью этих групп. В группе с высоким количеством 10 АгЯОР наблюдался самый низкий уровень ХА, что может быть объяснено несколькими факторами: более высокой пролиферативной активностью, которая приводит к быстрой элиминации ХА; более интенсивным белковым синтезом, который приводит к повышению скорости репаративных процессов (из-за интенсивного синтеза ферментов репарации); существованием возможных механизмов перехода неактивных ЯОР в активное состояние под действием неблагоприятных факторов среды, что ведет к повышению количества 10 АгЯОР индивидов.

Большинством исследователей принята концепция, согласно которой малые дозы радиации приводят к двум группам явлений: 1) адаптивному отклику в основной массе клеток; 2) аутоиндукции хромосомных аномалий, являющейся генетической адаптацией, направленной на образование клеток эволюционного резерва, способствующих после отбора выживанию клеточной популяции, но уже генетически измененной и адаптированной к новым условиям [3; 5; 6]. Такими адаптивными механизмами, возможно, являются ХА. В литературе имеются данные, что ХА — проявление сенсбилизации — адаптивного ответа [5]. Л.Г. Дубининой отмечено, что при кросс-адаптации происходит повышение уровня хроматидных перестроек [6]. В нашем случае количество хроматидных и хромосомных перестроек было приблизительно равным.

Рассматривая группу со средним количеством 10 АгЯОР как адаптивную норму, вполне логично полагать, что у них самый высокий уровень ХА, т.е. лучший адаптивный ответ. По мнению некоторых авторов, он заключается в амплификации некоторых генов, которые могут активизировать транскрипцию генов, отвечающих за индуцибельные ферменты [3; 5; 6]. Группа с низким количеством 10 АгЯОР занимает промежуточное положение по уровню ХА, что может объясняться, во-первых, менее интенсивной пролиферацией, а во-вторых, меньшими адаптивными способностями. Несмотря на полученные факты, нами обнаружено отсутствие линейной зависимости между АкЯОР и ХА. Выявлена лишь тенденция к снижению уровня ХА с повышением количества 10 АгЯОР.

В результате исследования доказано влияние активности ЯОР хромосом и образование хромосомных aberrаций на развитие АГ у человека. Впервые было показано, что в группе лиц с высокой транскрипционной активностью ЯОР хромосом самый низкий уровень хромосомных aberrаций, что объяснимо высокой пролиферативной активностью этой группы, а также более интенсивным белковым синтезом (в том числе ферментов репарации). Получены подтверждения сведениям об адаптивном значении хроматидных поломок хромосом, задерживая развитие АГ. При этом они преобладали в группе со средним значением активности ядрышкообразующих районов хромосом (адаптивная норма) и незначительно представлены в других группах.

Таким образом, установлена взаимосвязь функционального Ag-полиморфизма и уровня хромосомных aberrаций у человека с развитием АГ, при этом между этими признаками отсутствуют линейные зависимости.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] 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.
- [2] Бочков Н.П., Шрам Р.Я., Кулешов Н.П. и др. Система оценки химических веществ на мутагенность для человека: общие принципы, методические рекомендации и практические разработки // Генетика. — 1975. — Т. 11. — С. 156—169.
- [3] Дубинин Н.П., Алтухов Ю.П., Курбатова О.Л. Интегральная генетическая характеристика «адаптивной нормы» в популяции человека // Доклады Академии наук СССР. — 1976. — № 4. — С. 957—960.
- [4] Дубинина Л.Г. Лейкоциты крови человека — тест-система для оценки мутагенов среды. — М.: Наука, 1977.
- [5] Дубинина Л.Г. Структурные aberrации хромосом, индуцированные γ -излучением, и кросс-адаптация у *Srepis capillaris* // Генетика. — 1996. — № 3. — С. 373—378.
- [6] Дубинина Л.Г., Курашова З.И., Волкова И.В. Малые дозы ионизирующих излучений и индуцибельная система репарации // Докл. АН СССР. — 1990. — Т. 311. — № 2. — С. 481—484.
- [7] Иванов В.П., Мандрик И.А., Амелина И.В. Современные экологические проблемы провинции. Международный экологический форум. — Курск, 1995.
- [8] 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.
- [9] Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высшая школа, 1990.
- [10] Ляпунова Н.А., Еголина 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.
- [11] 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.

- [12] Современные методы хромосомного анализа в клинко-цитогенетических исследованиях. — М.: Медицина, 1994.
- [13] Трубников В.И., Гиндилис В.М. Многомерный генетический анализ антропометрических показателей. Сообщение 1. Генетическая корреляция между признаками // Вопросы антропологии. — М.: Медицина, 1980. — Вып. 64. — С. 94—106.
- [14] Howell W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes // Chromosome. — 1977. — Vol. 62. — № 4.
- [15] 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. — V. 263. — № 4. — P. 197—201.
- [16] Hofgartner F.I., Schmid M., Krone M. Pattern of activity of nucleolus organizer during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining // Chromosoma. — 1979. — Vol. 71. — № 2. — P. 197—216.

THE LEVEL OF CHROMOSOME ABERRATIONS AND THE ACTIVITY OF CHROMOSOMES' KERNEL-FORMING AREAS IN THE KURSK REGION

I.N. Medvedev, I.V. Amelina

The Kursk Institute of Social Education (branch)
of the Russian State Social University
Str. K. Marks, Kursk, Russia

The aim of the research is the study of the regularity of the phenotypic manifestation of the level of chromosome aberrations and of the transcriptional activity of chromosomes' kernel-forming areas on the example of arterial hypertension development. The obtained results proved the influence of the activity of the kernel-forming chromosomes' areas and the formation of chromosome aberrations on the development of the arterial hypertension in people. It was demonstrated for the first time that people with high transcriptional activity of chromosomes' kernel-forming areas have the lowest level of chromosome aberrations, which is explained by a high proliferative activity of this group and by a more intensive protein synthesis (including reparation proteins). The data on adaptive significance of chromatid chromosome destructions holding back the development of the arterial hypertension have been obtained. Thus, the interrelation between functional Ag-polymorphism and the level of chromosome aberrations during the development of arterial hypertension in people has been established, linear dependence being absent between these two characteristics.

Key words: Chromosome aberrations, chromosomes kernel-forming areas, Kursk region, Ag-polymorphism, arterial hypertension.