
ЗАВИСИМОСТЬ ПОПУЛЯЦИОННОГО Ag-ПОЛИМОРФИЗМА ОТ ИЗОЛЯЦИИ РАССТОЯНИЕМ СРЕДИ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ КУРСКОГО РЕГИОНА

И.В. Амелина

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

Используя визуальный полуколичественный метод серебрения ядрышкообразующих районов хромосом оценен их популяционный полиморфизм у коренных жителей Курской области. У коренного населения Курской области функциональная активность ЯОР хромосом составила $19,46 \pm 0,13$ у.е. при наличии небольшого количества ЯОР с размерами 0 и 4 у.е., являющихся генетическими маркерами изоляции расстоянием в популяции.

Ключевые слова: ядрышкообразующие районы хромосом, Ag-метод, Ag-полиморфизм, изоляция расстоянием, коренное население.

В течение трех последних десятилетий интенсивное развитие цитологии позволило решить ряд важнейших проблем биологии и медицины, связанных с изучением хромосомного аппарата человека. Эти достижения стали возможны благодаря новому методу хромосомного анализа — Ag-окрашивания [5].

Ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом у человека локализируются в коротких плечах (вторичных перетяжках) пяти пар акроцентрических хромосом (13—15 и 21—22). Ядрышкообразующие районы акроцентрических хромосом объединяются в период интерфазы в одно или несколько ядрышек [7—9], где происходит синтез рибосомных РНК. В ядрышкообразующих районах локализируются рибосомные гены, которые у человека представлены множественными копиями (от 350 до 600 на диплоидный набор хромосом).

С разработкой в 1970-е гг. метода селективной окраски серебром ЯОР хромосом впервые появилась возможность на цитологическом уровне изучать транскрипционную активность этих районов, что открыв новый тип полиморфизма хромосом человека — Ag-полиморфизм, ставшего предметом активного изучения [10—11]. В результате проведенных исследований, выполненных преимущественно на хромосомах лимфоцитов периферической крови у человека, было установлено, что серебрению подвержены только те ЯОР, которые были активны в предшествующей данному митозу интерфазе [7—9]. Было предложено суммарный размер AgЯОР десяти акроцентрических хромосом (10AgЯОР), выраженный в условных единицах (у.е.), рассматривать как критерий активности ЯОР [2]. Варианты AgЯОР каждой акроцентрической хромосомы наследуются в поколениях как независимые менделирующие признаки. Сумма размеров 10AgЯОР характеризует количество активных ЯОР в клетке и служит основой для сравнения индивидуальных геномов по этому признаку (Ag-полиморфизм), варьируя от 15 до 23 у.е.

В популяционно-генетических исследованиях представляется очень перспективной работа с генетическими маркерами, имеющими широкий популяционный

полиморфизм. В качестве такого маркера может выступать способность кислых белков ЯОР районов окрашиваться серебром — Ag-активность. В литературе встречаются отдельные данные по изучению популяционного Ag-полиморфизма, но нет работ по изучению связи активности ЯОР с фенотипическими особенностями людей в условиях изоляции расстоянием, что и определило проведение данного исследования.

Целью исследования явилось изучение закономерности фенотипического проявления транскрипционной активности ЯОР на популяционном уровне через показатели изоляции расстоянием.

Материал методы исследования. Материалом исследования послужила случайная выборка из 215 жителей Поныровского, Октябрьского и Курского районов Курской области. Исследовалась периферическая кровь, которую забирали из локтевой вены. Культивирование крови и приготовление препаратов метафазных хромосом проводили по общепринятой методике [4]. 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 ЯОР использовали метод, предложенный W.M. Howell [11]. 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 ее и слипаются вместе, образуя общий конгломерат).

Для сравнения окрашенных серебром хромосом использовали обобщенный показатель суммарной интенсивности окраски серебром всех ЯОР хромосом метафазной пластинки, являющийся суммой баллов интенсивности окраски во всех (в проведенном исследовании 20) метафазных пластинках делили на число исследованных метафаз.

Статистическая обработка материала проведена на ПВМ IBM PC/AT (486) с использованием программы GEN 1 и пакета прикладных программ. Нормальность распределения оценивалась 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 равным 0,05 [6].

Результаты исследования. Уровень функциональной активности ЯОР хромосом среди коренных жителей Курской области в среднем составил $19,46 \pm 0,13$ у.е., при величине D-ЯОР $11,68 \pm 0,09$ у.е., и G-ЯОР — $7,78 \pm 0,07$ у.е.

По суммарной активности ЯОР все индивидуумы были подразделены на группы с низким (15—17,99 у.е.) — 29%, средним (18—20,49 у.е.) — 41%, высоким количеством 10AgЯОР ($> 20,5$ у.е.) — 31%.

Анализ размеров ЯОР хромосом группы D показал, что основное количество составляли хромосомы с ЯОР, равными 3, 2 и 1 у.е. Незначительно преобладали D-ЯОР с 1 у.е. ($33,8 \pm 1,32\%$). Анализ размеров ЯОР хромосом группы G показал, что основное количество составляли хромосомы с ЯОР, равными 3, 2 и 1 у.е. В этой группе преобладали G-ЯОР с 3 у.е. ($42 \pm 1,86\%$). Практически отсутствовали хромосомы с ЯОР, равными 0 и 4 у.е.

Таким образом, все полученные данные по Ag-полиморфизму подчинялись нормальному распределению и не расходились с другими исследованиями, проведенными ранее в нашей области [2].

Для оценки транскрипционной активности ЯОР при изоляции расстоянием оценены показатели активности ЯОР с учетом расстояний между местами рождения предков трех поколений всех 215 жителей Курской области (родителей, бабушек и дедушек пробандов), включенных в исследование. В случае, когда предки происходили из одного населенного пункта, расстояние между ними приравнивалось к нулю (табл.).

Таблица

Сравнительная характеристика показателей изоляции расстоянием и количества активных ядрышкообразующих районов хромосом среди жителей Курской области ($n = 215$)

Характеристики средних расстояний между местом рождения	I, $n = 54$ $\bar{X}_1 \pm Sx$	II, $n = 78$ $\bar{X}_2 \pm Sx$	III, $n = 53$ $\bar{X}_3 \pm Sx$	I—II $t > 1,98$	I—III $t > 1,98$	II—III, $t > 1,98$
Родителей	$78,27 \pm 42,03$	$45,98 \pm 16,52$	$17,3 \pm 7,38$	1,97	2,46	2,41
Бабушки и дедушки по линии отца	$5,48 \pm 2,32$	$4,88 \pm 2,79$	$1,13 \pm 0,19$	3,42	3,49	2,51
Бабушки и дедушки по линии матери	$55,37 \pm 25,48$	$15,19 \pm 10,79$	$2,10 \pm 0,73$	2,14	4,10	8,73
Всех предков	$32,11 \pm 14,69$	$17,90 \pm 2,36$	$7,51 \pm 0,36$	Нет данных	3,24	2,81
Бабушек	$112,79 \pm 45,7$	$35,20 \pm 7,00$	$18,61 \pm 2,5$	2,67	3,90	2,22
Дедушек	$74,62 \pm 28,89$	$42,02 \pm 14,12$	$30,27 \pm 2,5$	Нет данных	2,82	2,58
Бабушек по линии матери и дедушек по линии отца	$119,39 \pm 45,7$	$34,66 \pm 12,98$	$16,19 \pm 2,7$	2,91	4,25	2,36
Бабушек по линии отца и дедушек по линии матери	$67,82 \pm 28,90$	$42,59 \pm 13,58$	$29,88 \pm 2,5$	Нет данных	2,41	Нет данных
Суммарное расстояние всех предков	$374,59 \pm 26,03$	$154,27 \pm 46,6$	$62,7 \pm 2,64$	2,56	3,43	3,72

Установлена высокая степень различий между всеми изучаемыми группами. С увеличением количества ЯОР у обследуемого наблюдалось уменьшение расстояния между местами рождений предков трех поколений.

Так, различия между группами с низким и средним количеством 10AgЯОР наблюдались по расстоянию между местами рождений бабушек и дедушек по линии матери ($t = 2,10$), бабушек ($t = 2,57$), бабушек по линии матери и дедушек по отцу ($t = 2,79$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 2,51$).

Между группами обследуемых с низким и высоким количеством 10AgЯОР различия достигали достоверного уровня значимости по расстоянию между местами рождений родителей ($t = 2,12$), бабушек и дедушек по отцу ($t = 3,29$) и матери ($t = 2,14$), всех предков ($2,93$), бабушек по матери и дедушек по отцу ($t = 3,45$), бабушек по отцу и дедушек по матери ($t = 2,79$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 3,72$).

Наблюдались достоверные различия между группами со средним и высоким количеством 10AgЯОР по расстояниям между местами рождений родителей ($t = 2,11$), бабушек и дедушек по отцу ($t = 2,25$) и матери ($t = 2,96$), всех предков ($3,05$), бабушек по матери и дедушек по отцу ($t = 2,01$), бабушек по отцу и дедушек по матери ($t = 2,68$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 3,06$).

Был проведен сравнительный анализ среди женщин по данным изоляции расстоянием с учетом количества ЯОР у пробандов.

У женщин установлена высокая степень различий между всеми изучаемыми группами по всем показателям изоляции расстоянием. С увеличением количества ЯОР у женщин наблюдалось уменьшение расстояния между местами рождений предков трех поколений, которые были достоверны во всех случаях за исключением расстояния между местами рождений бабушки и дедушки по отцу в группах с низким и высоким количеством 10AgЯОР.

Наибольшие различия между группами с низким и средним количеством 10AgЯОР наблюдались по расстоянию между местами рождений: бабушек по линии матери и дедушек по отцу ($t = 19,12$), дедушек по линии матери и бабушек по отцу ($t = 8,58$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 14,06$).

Между группами обследуемых со средним и высоким количеством 10AgЯОР наибольшие различия достигали по расстоянию между местом рождения: бабушек и дедушек по отцу ($t = 24,64$) и матери ($t = 20,75$), всех предков ($24,46$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 21,93$).

Наибольшие различия между группами с низким и высоким количеством 10AgЯОР наблюдались по расстояниям между местами рождений: всех предков ($20,95$), бабушек по матери и дедушек по отцу ($t = 23,79$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 24,11$).

Нами был проведен сравнительный анализ между мужчинами по данным изоляции расстоянием, полученные данные сравнивались между собой в зависимости от количества ЯОР у пробандов.

Результаты сравнительного анализа у мужчин показывали высокую степень различий между всеми изучаемыми группами по всем показателям изоляции расстоянием. С увеличением количества ЯОР у мужчин наблюдалось уменьшение

расстояния между местами рождений предков трех поколений, которые были достоверны во всех случаях.

Наибольшие различия между группами с низким и средним количеством 10AgЯОР наблюдались по расстоянию между местами рождений: бабушек и дедушек по линии матери ($t = 2,10$), бабушек по линии матери и дедушек по отцу ($t = 2,79$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 2,51$).

Между группами обследуемых с низким и высоким количеством 10AgЯОР различия достигали достоверного уровня значимости по расстоянию между местами рождений: родителей ($t = 2,12$), бабушек и дедушек по отцу ($t = 3,29$) и матери ($t = 2,14$), всех предков (2,93), бабушек по матери и дедушек по отцу ($t = 3,45$), бабушек по отцу и дедушек по матери ($t = 2,79$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 3,72$).

Достоверные различия между группами со средним и высоким количеством 10AgЯОР наблюдались по расстояниям между местами рождений: родителей ($t = 2,11$), бабушек и дедушек по отцу ($t = 2,25$) и матери ($t = 2,96$), всех предков (3,05), бабушек по матери и дедушек по отцу ($t = 2,01$), бабушек по отцу и дедушек по матери ($t = 2,68$) и суммарным расстоянием между всеми предками ($t = 3,06$). Таким образом, в исследовании найдена четкая связь между уровнем Ag-полиморфизма у человека и географическим удалением мест рождений его предков.

Обсуждение результатов. В ходе исследования популяционных характеристик Ag-полиморфизма среди жителей Курской области выявлено повышение транскрипционной активности ЯОР хромосом в условиях изоляции расстоянием, выражающей в незначительном присутствии AgЯОР с 0 у.е. Функциональный Ag-полиморфизм среди жителей Курской области находился в нормативных пределах. Особенности Ag-полиморфизма у них в условиях изоляции расстоянием заключались в преобладании у хромосом группы ДЯОР с 1 у.е., у хромосом группы G — с 3 у.е., при малом количестве ЯОР с размерами 0 и 4 у.е. При этом происходит разделение популяции на доминантные и рецессивные аллели [1]. Ввиду существования некоторого порогового значения 10AgЯОР, ниже которого происходит элиминация зиготы на ранних этапах дробления, происходит выживание особей, содержащих доминантные аллели, что ведет к повышению количества активных ЯОР у индивидуумов при незначительном присутствии хромосом с отсутствием серебрищихся районов. Накопление же ЯОР с крупными Ag-блоками (4 у.е.), может происходить при крайне неблагоприятных условиях [3]. Курская область к таким районам не относится, поэтому в популяции Курской области ЯОР с 4 у.е. присутствуют в очень небольшом количестве.

Сравнительный анализ групп добровольцев по количеству 10AgЯОР показал высокую степень различий между изучаемыми показателями изоляции расстоянием. С увеличением количества 10AgЯОР расстояния между местами рождений предков двух поколений меньше. При изоляции расстоянием накопившиеся доминантные аллели в популяции ведут к повышению количества 10AgЯОР у индивидуумов по мере уменьшения расстояния между местами рождений их бли-

жайших предков. В то же время с уменьшением количества 10AgЯОР расстояния между местами рождений предков двух поколений увеличиваться, что мы и наблюдали при проведении настоящего исследования. В группе с низким количеством 10AgЯОР обследуемых наблюдаются самые большие расстояния между местами рождений предков двух поколений, нося в группе со средним количеством 10AgЯОР промежуточный характер. Разделение выборки на мужчин и женщин значительно увеличило различия между группами с разным количеством 10AgЯОР. Достоверные различия наблюдались по всем показателям и между всеми группами как у мужчин, так и у женщин.

Таким образом, изоляция расстоянием в значительной мере влияет на Ag-полиморфизм у жителей Курской области, обеспечивая у них работу механизма адаптации к действию неблагоприятных факторов внешней среды.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Наука, 1989.
- [2] *Викторов В.В., Еголина Н.А., Ляпунова Н.А.* Сравнение Ag-вариантов ядрышкообразующих хромосом человека в популяциях Москвы и Забайкалья // II всесоюзный съезд медицинских генетиков: Тезисы докладов. — М., 1990. — С. 77—78.
- [3] *Графодатский А.С.* Сравнительная цитогенетика трех видов собачьих (Carnivora, Canidae). Сообщение 3. Распределение ядрышкообразующих районов // Генетика. — 1983. — № 5. — С. 778—782.
- [4] *Залетаева Т.А., Кулешиов Н.П., Залетаев Д.В., Барцева О.Б.* Современные методы хромосомного анализа в клинико-цитогенетических исследованиях: Российская мед. акад. последип. образ. — М.: Медицина, 1994.
- [5] *Каралова Е.М., Аброян Л.О., Акоюн Л.О., Карагезян К.Г.* Поведение ядер и ядрышкообразующих районов хромосом лимфоцитов на разных стадиях развития периодической болезни // Цитология. 2004. — Т. 46. — № 4. — С. 376—380.
- [6] *Лакин Г.Ф.* Биометрия: Учеб. пособие. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высшая школа, 1990.
- [7] *Ляпунова Н.А.* Полиморфизм ядрышкообразующих районов хромосом человека: структурные и функциональные аспекты // II всесоюзный съезд медицинских генетиков: Тезисы докладов. — М., 1990. — С. 537—538.
- [8] *Ляпунова Н.А., Еголина 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.
- [9] *Ляпунова Н.А. и др.* Ядрышкообразующие районы (ЯОР) хромосом человека: опыт количественного цитологического и молекулярного анализа // Биологические мембраны. — 2001. — Т. 18. — № 3. — С. 189—199.
- [10] *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.
- [11] *Howell W.M.* Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes // Chromosome. — 1977. — Vol. 62. — № 4.

DEPENDENCE POPULATION AG-POLYMORPHISM FROM ISOLATION OF DISTANCE AMONG THE RADICAL POPULATION OF KURSK REGION

I.V. Amelina

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

The influence of the isolation by distance on the populational Ag-polymorphism among the natives of the Kursk region. Using the visual semi-quantitative method of silvering of the chromosomes' kernal forming areas (kfa), their populational polymorphism among the natives of the Kursk region has been estimated. Their functional activity of the chromosomes' kfa proved to be $19,06 \pm 0,14$ conventional units (c.u.) with a small amount of kfa being 0 and 4 c.u. in size, which appear to be genetical markers of the isolation by distance in a population.

Key words: nucleus organizing regions, Ag-method, Ag-polymorphism, isolation of distance, radical population.