

Однако реальная картина изменчивости намного сложнее. В качестве общей «точки сравнения» мы использовали среднюю частоту CCR5del32 в русских популяциях, поскольку из всех народов Европы именно русские могли создать некий фон мигрантных генов в тюркоязычных популяциях. Однако русский ареал охватывает и север Европы, где частота делеции велика. На юге Европы, где и проживают тюркоязычные популяции, частота делеции снижается. Поэтому для корректного анализа необходимо сравнить каждую тюркоязычную популяцию с ее непосредственным географическим соседом. Такой анализ станет следующим этапом наших дальнейших исследований.

Работа проведена при поддержке грантов РФФИ и РГНФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balanovsky O, Pocheshkhova E, Pshenichnov A, Solovieva D, Kuznetsova M, Voronko O, Churnosov M, Tegako O, Atramentova L, Lavryashina M, Evseeva I, Borinska S, Boldyreva M, Dubova N, Balanovska E. Is spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5Delta32 allele formed by ecological factors? // Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Sciences. 2005 Jul; 24(4):375-382.
2. Nei M. Molecular population genetics and evolution / Amsterdam: North-Holland Publ.C. 1975. 290 p.
3. Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley G, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M. Dating the origin of the CCR5-D32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes // Am J Hum Genet. 1998. 62: P.1507–1515.

РЕЗЮМЕ

Исследован генетический полиморфизм трех тюркоязычных народов Европы по частоте делеции в аутосомном СПИД-протекторном локусе CCR5. Показано, что частота делеции соответствует языковой общности популяций.

Genetic polymorphism of Turkic-speaking populations of Europe has been studied in AIDS-protecting locus CCR5. It is shown that the frequency of the deletion is connected with linguistic affiliation.

ПЛІНСЬКА М.А., ДИБСЬКИЙ С.С., ДИБСЬКА О.Б., ПЕДАН Л.Р.

*Науковий Центр радіаційної медицини АМН України,
Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: pww@ukr.net*

ВИЯВЛЕННЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ ЗА ЧУТЛИВІСТЮ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ДО ТЕСТУЮЧОЇ МУТАГЕННОЇ ДІЇ БЛЕОМІЦИНУ *IN VITRO*

У віддалені строки після Чорнобильської аварії провідне значення для реалізації стохастичних і деяких нестохастичних медичних наслідків променевого ураження

людини має радіаційно-індукована нестабільність геному [1, 2]. На цитогенетичному рівні важливу роль в дестабілізації геному відіграє прихована хромосомна нестабільність при нормальному чи аберантному каріотипі, яка проявляється як підвищення чутливості хромосом соматичних клітин людини до дії інших мутагенів – *in vivo* та *in vitro*.

Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності використовуються т. з. „мутагени-провокатори” – в основному, іонізуюче випромінювання та, як альтернатива опроміненню, радіоміметик блеоміцин, якими обробляється культура лімфоцитів периферичної крові людини на ранній чи пізній постсинтетичній стадії мітотичного циклу (G_2 -sensitivity assay) [3-5].

Тести для визначення індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії опромінення чи блеоміцину одержали найбільше поширення при обстеженні онкологічних пацієнтів, переважно, для виявлення гіперчутливих осіб, схильних до виникнення та розвитку злоякісних новоутворень різної локалізації [6, 7]. В результаті проведених нами цитогенетичних обстежень Чорнобильських контингентів встановлено реальність радіоіндукованої зміни стабільності геному соматичних клітин людини і необхідність подальшого удосконалення і стандартизації моделі для її виявлення [8].

Оскільки на сьогодні не існує уніфікованої тест-системи для оцінки індивідуальної чутливості хромосом людини до мутагенної дії блеоміцину, різні дослідники використовують блеоміцин як мутаген-провокатор в широкому діапазоні концентрацій, що утруднює порівняння одержаних результатів. Враховуючи це, змістом першого етапу наших досліджень було відпрацювання модельної тест-системи для виявлення прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові контрольних (умовно здорових) донорів.

Матеріал та методи

Для цитогенетичного аналізу цільну кров (~ 3 мл від кожної особи) культивували за напівмікрометодом у нашій модифікації [8]. При постановці експериментів використовували гідрохлорид блеоміцину для ін'єкцій (Bleocin, BLM, Nippon Kayaku Co. LTD). Базовий розчин та необхідні розведення готували за допомогою стерильного 0,9 % розчину хлористого натрію. Блеоміцин додавали до культури лімфоцитів через 48 годин після початку інкубації, тобто обробляли культуру *in vitro* на пізній постсинтетичній (G_2) стадії мітотичного циклу. Цитогенетичний аналіз проводили “всліпу”, на рівномірно пофарбованих зашифрованих препаратах метафазних хромосом під мікроскопами зі збільшенням $\times 1000$. Кількість проаналізованих метафаз для кожного з варіантів залежала від мітотичного індексу культури і коливалась від 50 до 500, складаючи в середньому 200 на варіант, що відповідало вимогам, необхідним для дослідження цитогенетичного ефекту хімічних сполук в культурі лімфоцитів периферичної крові людини *in vitro* [9]. Всього проаналізували 8875 метафаз. Для оцінки стабільності хромосомного апарату враховували всі аберації хроматидного та хромосомного типів, які вірогідно можна розпізнати при груповому каріотипуванні на рівномірно пофарбованих препаратах метафазних хромосом [9].

Результати та обговорення

Спочатку нами було апробовано цитогенетичну дію 4-х найчастіше застосовуваних концентрацій блеоміцину (0,05; 5,00; 50,00; 500,00 мкг/мл) в культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від 7-ми умовно здорових донорів (всі чоловіки) середнього віку. Кожну концентрацію тестували у двох-трьох повтореннях.

При дії блеоміцину *in vitro* спостерігали дозозалежний цитогенетичний ефект – частоти аберантних метафаз та хромосомних аберацій зростали із підвищенням концентрації препарату і коливались від 4,50 до 48,00 % та від 5,50 до 150,0 на 100 метафаз (при мінімальній та максимальній концентрації блеоміцину, відповідно), що достовірно ($p < 0,01$) перевищувало аналогічні контрольні показники (1,12 % та 1,23 на

100 метафаз, відповідно). При всіх концентраціях блеоміцину (навіть при мінімальній – 0,05 мкг/мл) кількість аберацій перевищувала кількість аберантних метафаз (тобто частина аберантних клітин містила більше однієї аберації), і при максимальній концентрації (500 мкг/мл) на одну аберантну клітину в середньому припадало 3,61 хромосомних уражень. При концентраціях 50 та 500 мкг/мл спостерігали не тільки значний цитогенетичний ефект (навіть до пульверизації хромосомного матеріалу), але й виражену цитотоксичну дію – прогресуюче зниження мітотичної активності, що значно утруднювало проведення хромосомного аналізу. Пошкодження хромосом були представлені переважно простими абераціями – парними та одиночними ацентричними фрагментами з домінуванням останніх, що характерно для кластогенної дії блеоміцину *in vitro*. Частоти обмінних аберацій не залежали від концентрації препарату і знаходились в межах спонтанних коливань. При порівнянні цитогенетичного ефекту, індукованого блеоміцином в однакових концентраціях в культурах, одержаних від різних донорів, встановили, що за інтегральними цитогенетичними показниками (частоти аберантних клітин та всіх типів аберацій) група була досить гомогенна - донори майже не відрізнялись, але за окремими типами аберацій (співвідношення між одиночними та парними ацентричними фрагментами) спостерігались певні міжіндивідуальні коливання.

За результатами тестування цитогенетичної активності блеоміцину для подальших досліджень було відібрано дві оптимальні концентрації препарату – 0,05 та 5,00 мкг/мл, при яких майже не пригнічувалась мітотична активність культури та спостерігалось достовірне зростання частоти хромосомних аберацій без пульверизації хромосомного матеріалу. Оскільки навіть при цих концентраціях блеоміцину підвищувалась «завантаженість» аберантних метафаз хромосомними пошкодженнями (з'являлись мультиаберантні клітини), саме частоту аберацій хромосом (а не аберантних метафаз) вважали основним критерієм чутливості хромосом людини до тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином.

На відпрацьованій моделі проведено дослідження стабільності хромосом лімфоцитів в контрольній групі - у 9-ти умовно здорових донорів (3-х жінок, 6-ти чоловіків у віці 18–64 роки), які заперечували свідомий контакт із знаними чи потенційними мутагенами.

Фонові середньогрупові частоти хромосомних аберацій в обстеженій групі складала $1,23 \pm 0,20$ на 100 клітин, що не відрізнялося від середньопопуляційного рівня ($1,52$ на 100 клітин), ($p > 0,01$) [8, 9]. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації – одиночні та парні ацентричні фрагменти, співвідношення між їх частотами наближалось до 1:1.

Після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл середньогрупові частоти хромосомних аберацій зросли до $10,37 \pm 0,66$ на 100 метафаз, що достовірно ($p < 0,01$) відрізнялось від такої в інтактних культурах ($1,23 \pm 0,20$ на 100 метафаз). Середня частота аберацій на одну аберантну клітину досягала 2,18. Додаток до фонові середньогрупові частоти хромосомних аберацій (надспонтанна частота) складав 9,14 на 100 метафаз. Серед пошкоджень хромосом домінували прості аберації (одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні, близькому до 1:1) – як у окремих осіб, так і по групі в середньому.

За всіма цитогенетичними показниками і, особливо, за загальною частотою хромосомних аберацій, зумовленою фрагментацією хромосом, спостерігали певну міжіндивідуальну варіабільність, яка не залежала від величини фонових даних, одержаних в інтактних культурах (рис.1). Міжіндивідуальний розмах частоти хромосомних аберацій складав 3,00 - 32,00 на 100 метафаз. Серед групи порівняння виділявся донор № 5 з максимальним цитогенетичним ефектом (32,00 аберацій на 100 метафаз) та максимальною «завантаженістю» аберантних клітин пошкодженнями хромосом (4,92 на одну аберантну метафазу), хоча фонові частоти хромосомних

аберацій у нього складала лише 1,00 на 100 метафаз. Таким чином, використання блеомицину як мутагена-провокатора в концентрації 0,05 мкг/мл дозволило ідентифікувати одну особу з підвищеною чутливістю до мутагенної дії.

При дії блеомицину в концентрації 5,0 мкг/мл зросли як індивідуальні частоти хромосомних аберацій, так і їх середньогруповий рівень (до $15,54 \pm 0,78$ на 100 метафаз), але середня кількість аберацій в одній абераційній клітині не тільки майже не змінилась, але й виявила тенденцію до зниження і складала 1,80, що може бути зумовлено цитотоксичною дією препарату. Надспонтанна (індукована) частота хромосомних аберацій також достовірно підвищилась і по групі в середньому становила 14,31 на 100 метафаз. Основним типом хромосомних пошкоджень залишились прості аберації – одиночні та парні ацентричні фрагменти у співвідношенні близькому до 1:1.

Реакція хромосомного апарату на дію мутагена-провокатора в концентрації 5,0 мкг/мл суттєво відрізнялась у різних осіб. Окрім гіперчутливого індивіда № 5 (виявленого при навантаженні культури лімфоцитів блеомицином в концентрації 0,05 мкг/мл), при використанні препарату в концентрації 5,00 мкг/мл ідентифіковано ще двох осіб із прихованою хромосомною нестабільністю - №№ 6 та 9. Частота хромосомних аберацій у цих індивідів становила $35,0 \pm 3,37$; $16,00 \pm 2,32$; $34,00 \pm 3,35$ на 100 метафаз, відповідно, тоді як у інших осіб з цієї ж групи вона коливалась від 5,00 до 12,00 на 100 метафаз.

Висновки

З використанням модифікованого нами тесту „G₂-bleomycin sensitivity assay” виявлено трьох осіб, гіперчутливих до дії мутагена-провокатора, що, виходячи з їх анамнезу (відсутність контакту із відомими чи потенційними мутагенами), можна вважати генетично детермінованою прихованою хромосомною нестабільністю.

Література

1. Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение. // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2001. – т. 41, №35. – С. 272-289.
2. Smith L.; Nagar S., Kim G. Morgan W. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. // Health Physics. – 2003. – vol. 85, N 1. – P. 23–29.
3. Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer // Cytogen. and Genome Res. – 2004. – vol. 104, № 1–4. – P. 365–370.
4. Ryabchenko N., Dyomina E. Radiosensitivity of human chromosomes estimated on the basis of the application of the test-system of peripheral blood lymphocytes // Chromosome Res. – 2005. – vol. 13, Suppl. 1. – P. 3567.
5. Comparison of bleomycin and radiation in G₂ assay of chromatid breaks / A. Adema, J. Closs, R. Verheijen et al. // Int. J. Radiat. Biol. – 2003. – vol. 79, № 8. – P. 655–661.
6. Does the bleomycin sensitivity assay express cancer phenotype? / G. Szekely, E. Remenar, M. Rifsler et al. // Mutagenesis. – 2003. – vol. 18, № 1. – P. 59–63.
7. Non-random distribution of chromatid breaks in lymphocytes of laryngeal squamous cell carcinoma patients / M. Gajecka, M. Jarmuz, W. Szyfter et al. // Oncology Reports. – 2004. – № 12. – P. 153–157.
8. Педан Л.Р., Пілінська М.А. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro* // Доп. Національної Акад. наук України. – 2004. – № 12. – С. 175–179.
9. Хромосомы человека: Атлас / А.Ф. Захаров, В.А. Бенюш, Н.П. Кулешов, Л.И. Барановская. – М.: Медицина. – 1982. – 263 с.

Резюме

Отработана и апробирована модельная система для выявления скрытой хромосомной нестабильности в соматических клетках человека с помощью

тестирующей мутагенной нагрузки радиомиметиком блеомицином *in vitro*. Установлены оптимальные сроки обработки культуры лимфоцитов периферической крови человека блеомицином и оптимальные концентрации препарата, позволяющие оценить чувствительность хромосом к мутагенному воздействию.

Опрацьовано і апробовано модельну систему для виявлення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою тестуючого мутагенного навантаження радіоміметиком блеомицином *in vitro*. Визначено оптимальні строки обробки культури лімфоцитів периферичної крові людини блеомицином та оптимальні концентрації препарату, придатні для оцінки чутливості хромосом до мутагенної дії.

The model system for revealing of hidden chromosome instability in somatic human cells by means of radiomimetic bleomycin testing mutagenic exposure *in vitro* had been elaborated and aprobated. The optimal terms of treatment by bleomycin of human peripheral blood lymphocytes culture as well as optimal concentrations of bleomycin for the evaluation of human chromosomes sensitivity to mutagenic exposure had been suggested.

**ПШЕНИЧНОВ¹ А.С., БАЛАНОВСКИЙ¹ О.П., СОЛОВЬЕВА¹ Д.С.,
КУЗНЕЦОВА¹ М.А., ДИБИРОВА¹ Х.Д., ВАСИНСКАЯ¹ О.А., ФРОЛОВА¹ С.А.,
ИЩУК² М.Л., АТРАМЕНТОВА² Л.А., ЧУРНОСОВ³ М.И., ПУЗИНА¹ Т.А.,
БАЛАНОВСКАЯ¹ Е.В.**

¹ГУ Медико-Генетический научный центр РАМН, г. Москва, Россия;

²Харьковский государственный университет, г. Харьков, Украина;

³Белгородский Государственный Университет, г. Белгород, Россия.

pxemon@gmail.com

СХОДСТВО УКРАИНСКИХ И ДРУГИХ СЛАВЯНОЯЗЫЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПО ЧАСТОТАМ СПИД-ПРОТЕКТОРНОГО ГЕНА CCR5 del32

Один из важных генетических факторов устойчивости к ВИЧ-1 – делеция 32 нуклеотидов в гене CCR5 (CCR5del32) [Zimmerman et al., 1997] – генетически полиморфен. Его распространение на географической карте мира определяется сложным комплексом факторов [Balanovsky et al., 2005]. Часть этих факторов, вероятно, связана с отбором в пользу делеции del32: показана возможная роль этой мутации в повышении устойчивости к целому ряду инфекционных болезней, включая чуму [Stephens et al., 1998]. Делеция возникла относительно недавно - оценки времени возникновения колеблются в области 0,7-2 тыс. лет [Libert et al., 1998, Stephens et al., 1998]. А карта её распространения в Европе демонстрирует чёткий тренд уменьшения частоты делеции от северо-запада на юго-восток [Балановская, Балановский, 2007].

В настоящей работе впервые по частотам делеции CCR5del32 охарактеризовано внутриэтническое разнообразие украинского генофонда, представленного его основными этнотерриториальными подразделениями. Обследованы две популяции западных украинцев (Ивано-Франковская и Львовская области, N=57 и 102), подольские (Хмельницкая область, N=137), днепровские (Черкасская область, N=178) и восточные украинцы (Белгородская область, N=93). Частота делеции в изученных популяциях колеблется от 0.10 до 0.12, за исключением популяции из Ивано-Франковска, в которой частота делеции вдвое ниже.

В целом, частоты делеции CCR5del32 у украинцев хорошо соответствуют общему тренду изменчивости CCR5 в Европе – снижения частот мутации с севера на