

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Е. С. Афанасьева, С. Р. Рушковский, В. Ф. Безруков

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев*

Проведен сравнительный анализ цитогенетических проявлений нестабильности генома человека: частоты микроядер (ЧМЯ), одинарных и двойных фрагментов хромосом и уровня преждевременного расхождения хроматид (ПРХ). ПРХ и фрагменты хромосом были выбраны как возможные аномалии, приводящие к образованию микроядер. ЧМЯ определяли в буккальном эпителии (БЭ) и лимфоцитах периферической крови (ЛПК), уровни одинарных и двойных фрагментов хромосом, а также частоту ПРХ – в ЛПК. ЧМЯ в среднем была выше в БЭ, чем в ЛПК, и составила  $4,01 \pm 0,23\%$  и  $2,58 \pm 0,23\%$  соответственно. Средняя частота одинарных и двойных фрагментов хромосом была  $1,73 \pm 0,23\%$ , ПРХ -  $1,68 \pm 0,33\%$ . При корреляционном анализе не выявлено статистически значимой зависимости между выбранными параметрами. Следовательно, параметры являются независимыми и должны учитываться в комплексе для получения более полной оценки уровня и особенностей проявления нестабильности генома человека.

### Вступление

Нестабильность генома – это свойство генома, обеспечивающее его изменчивость и совокупность процессов, в результате которых это свойство реализуется – будь то изменение нуклеотидных последовательностей генома или непрерывности данных последовательностей. Таким образом, любое отклонение от исходно существующей структуры генома может учитываться как проявление нестабильности генома. Показателем стабильности или нестабильности генома является частота фиксируемых проявлений – уровень нестабильности.

Повышенный уровень нестабильности генома является вероятной причиной нарушений индивидуального развития организма, увеличения частоты генеративных и соматических мутаций, повышенного риска онкологических заболеваний, причиной ускоренного старения и сокращения продолжительности жизни [1]. Индивидуальный уровень нестабильности генома может зависеть от особенностей генотипа человека (генетически обусловленные вариации белков репарационной системы или систем метаболизма ксенобиотиков), от возраста, специфики действия на организм мутагенных и немутагенных факторов окружающей среды [2]. Поэтому он не является постоянной величиной и может варьировать в широких пределах. Кроме того, наблюдаемые уровни нестабильности генома могут отличаться при учете разных проявлений нестабильности генома или одних и тех же проявлений, но в разных тканях. Таким образом, возникает проблема поиска адекватных методов для определения уровня нестабильности генома, которые помогли бы оценить индивидуальный риск заболеваний, связанных с повышенной нестабильностью генома.

Для оценки нестабильности генома человека на цитогенетическом уровне чаще всего используют два подхода - анализ структурных аномалий хромосом и пloidности на стадии метафазы, а также анализ ЧМЯ в клетках различных тканей [3]. Для анализа хромосомных аномалий наиболее часто используют ЛПК, а для оценки ЧМЯ широко применяют клетки БЭ. В БЭ можно оценивать только ЧМЯ, а в ЛПК – как уровень хромосомных аномалий, так и ЧМЯ [4]. Однако уровень нестабильности генома, который определяется в подобного рода исследованиях, в значительной мере зависит от особенностей тканей (пролиферативной активности, срока жизни клеток и т.д.). Таким образом, возникает вопрос об экстраполяции результатов, полученных при исследовании одной из тканей на целый организм.

Цель данной работы состояла в сравнении информативности следующих параметров нестабильности генома: ЧМЯ в БЭ и ЛПК, одинарных и двойных фрагментов хромосом и

уровня ПРХ в ЛПК. ПРХ и фрагменты хромосом были выбраны как возможные аномалии, приводящие к образованию микроядер.

### Материалы и методы

При проведении эксперимента использовали две клеточные системы: клетки БЭ и ЛПК человека. БЭ и образцы крови были собраны у участников украинских антарктических экспедиций. В исследуемую группу вошли клинически здоровые мужчины возрастом от 29 до 52 лет.

Мазки БЭ фиксировали 96%-ным метанолом на протяжении 40 мин и окрашивали 2%-ным красителем Гимза. Препараты анализировали на наличие клеток с микроядрами, руководствуясь общепринятым критериям [5]

Цельную кровь (1 мл) культивировали в 5 мл среды IMDM при температуре 37 °С в течение 52 ч. В качестве митогена использовали ФГА-Р ("Геном", Донецк) в конечной концентрации 10 мкг на 1 мл среды. За 1,5 - 2 ч до окончания культивирования в культуру добавляли колхицин в конечной концентрации 1 мкг/мл. Приготовление препаратов хромосом проводили по стандартным методикам [6] При анализе учитывали метафазы с одиночными и двойными фрагментами хромосом, метафазы с ПРХ, а также одноядерные бласттрансформированные лимфоциты с микроядрами.

Статистическую обработку проводили по стандартным методикам.[7].

### Результаты и обсуждения

Для оценки уровня нестабильности генома были выбраны следующие параметры: ЧМЯ в БЭ и ЛПК, одинарных и двойных фрагментов хромосом и уровень ПРХ в ЛПК (рис. 1).

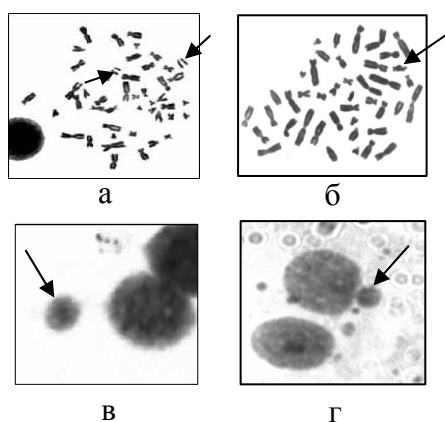


Рис. 1. Фотографии проанализированных параметров нестабильности генома. а - метафаза с ПРХ, б – одиночный фрагмент, в – микроядро в ЛПК, г – микроядро в БЭ.

#### Соотношение ЧМЯ в БЭ и лимфоцитах

ЧМЯ можно оценивать в клетках любой пролиферирующей ткани. Наиболее широко используют БЭ и лимфоциты периферической крови [4]. Особенности физиологии этих тканей (срок жизни клеток, функция ткани и т.д.) могут приводить к существенным различиям ЧМЯ этих клеток. С другой стороны, реакция генома на повреждающее воздействие зависит от работы одних и тех же репарационных систем, поэтому можно ожидать, что ЧМЯ в БЭ и ЛПК будут скоррелированы. Исходя из этого, первым этапом работы было сравнение ЧМЯ в клетках БЭ и ЛПК.

Для анализа соотношения ЧМЯ в БЭ и ЛПК было проанализировано 46 препаратов лимфоцитов и мазков БЭ, взятых у одних и тех же людей.

Средняя ЧМЯ в клетках БЭ составила  $4,01 \pm 0,23$  ‰, а в лимфоцитах -  $2,58 \pm 0,23$  ‰. Оба показателя не превышают общепопуляционных норм (примерно 5‰.[5, 8]). Разница в средних значениях является статистически значимой ( $p < 0,05$ ).

При попарном сравнении ЧМЯ в БЭ и ЛПК достоверной корреляции между этими значениями не было обнаружено (коэффициент корреляции  $r_s = -0,09$ ) (рис.2).

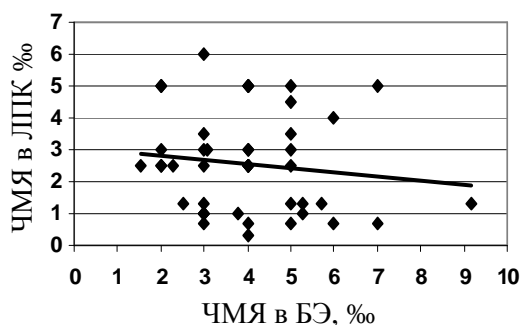


Рис. 2. Соотношение между ЧМЯ в ЛПК и БЭ. Коэффициент корреляции  $r_s = -0,09$

Отсутствие корреляции и разницу в средних значениях ЧМЯ можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, особенностями контакта клеток этих тканей с повседневными химическими мутагенами [9]. БЭ является барьерной тканью, и основное повреждающее воздействие на его клетки оказывают прямые мутагены, в то время как ЛПК контактируют скорее с метаболитами ксенобиотиков, которые могут уже не обладать мутагенной активностью. Влияние радиационной компоненты в данном случае может быть существенным только при внутренних источниках излучения, однако особенности распределения их в организме требует дополнительного, детального изучения. Во-вторых, отсутствие корреляции и разницу в средних значениях ЧМЯ можно объяснить особенностями методического подхода. Клетки БЭ, которые снимаются шпателем, представляют собой популяцию клеток примерно одного возраста, и, таким образом, регистрируемый уровень микроядер – проявление повреждений, произошедших синхронно. Микроядра в ЛПК учитывались в одноядерных клетках (эксперимент без цитохалазинового блока). Поскольку средняя продолжительность жизни лимфоцитов составляет три месяца [10], то в данном случае учитывались клетки разного возраста, а следовательно, результат асинхронного влияния повреждающих факторов на геном. Еще одной причиной, приводящей к различиям между уровнями ЧМЯ в ЛПК и БЭ, может служить различная скорость гибели и элиминации клеток с повреждениями. Таким образом, уровни микроядер в ЛПК и БЭ являются независимыми параметрами нестабильности генома.

### Соотношение ЧМЯ в ЛПК с частотой одинарных и двойных фрагментов и ПРХ

Микроядра могут состоять из ацентрических фрагментов и хромосом, отставших от веретена деления. Можно предположить, что уровень микроядер на стадии интерфазы будет коррелировать с уровнем одинарных и двойных фрагментов и ПРХ на стадии метафазы, т.е. эти параметры обладают одинаковой информативностью. Вторым этапом нашего исследования было сравнение ЧМЯ в ЛПК и уровней одинарных, двойных фрагментов и ПРХ.

Для анализа соотношения ЧМЯ и выбранных хромосомных аномалий в ЛПК было проанализировано 48 индивидуальных препаратов. При анализе ЧМЯ учитывали только бласттрансформированные лимфоциты. Таким образом, интерфазные клетки и клетки стадии метафазы относились к одной популяции – Т-лимфоцитам.

Среднее значение ЧМЯ и двойных фрагментов составляло  $1,73 \pm 0,23\%$ , ПРХ -  $1,68 \pm 0,33\%$ , при среднем значении ЧМЯ в ЛПК -  $0,27 \pm 0,02\%$ . Поскольку микроядра образуются как из ацентрических фрагментов, так и из отставших хромосом, для сравнения результатов мы выбрали суммарную частоту фрагментов и ПРХ. ПРХ считается одним из параметров нарушения нормальной сегрегации хромосом по дочерним клеткам и, следовательно, одной из причин возникновения анеуплоидных клеток [11].

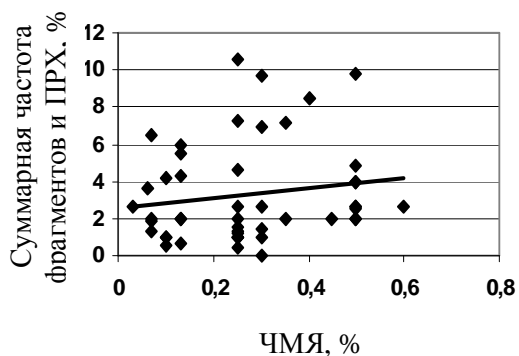


Рис. 3 Соотношение между и суммарной частотой фрагментов и ПРХ. Коэффициент корреляции  $r = 0,23$ .

При сравнении суммарного значения частоты фрагментов и ПРХ с ЧМЯ статистически значимой корреляционной зависимости не обнаружено (рис.3). Отсутствие корреляции между данными параметрами можно объяснить тем, что при анализе ПРХ и разрывов учитываются метафазы первого митоза после введения клеток в культуру – это аномалии хромосом, которые возникли *de novo*. Клетки с микроядрами, как было указано ранее, возникли гораздо раньше во время лимфопоза.

### Выводы

Исследованные параметры нестабильности генома являются независимыми и должны учитываться в комплексе для получения более полной оценки уровня и особенностей проявления нестабильности генома человека.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jackson A.L., Loeb L.A. The Mutation Rate and Cancer // *Genetics* . – 1998. – Vol. 148. – P. 1483 – 1491.
2. Yu Z., Chen J., Ford B. N. et al. Human DNA repair systems: an overview // *Environ Mol Mutagen.* – 1999. – Vol. 33. – P. 3 – 20.
3. Fenech M., Holland N., Chang W.P. et al. The Human MicroNucleus Project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans // *Mut. Res.* – 1999 - Vol. 428 - P. 271 – 283.
4. Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans // *Mut. Res.* - 2000. – Vol. 463. – P. 111 – 172.
5. Tolbert E.P., Shy M.C., Allen W. J. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. // *Mut. Res.* - Vol. 271 - 1992. - P. 69 – 77.
6. Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. – М.: Мир, 1986. – 268 с.
7. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. - М.: Медицина, 1975. - 296 с.
8. Безруков В., Моисеенко Е., Рушковский и др. Оценка уровня нестабильности генома зимовщиков // *Вестн. Киев. ун-та. Биология.* – 2002. – Вып. 36-37. – С. 19 – 22.
9. Журков В.С., Выскубенко И.Ф., Сычева Л.П. Сравнение чувствительности к мутагену соматических клеток разных тканей млекопитающих // *Гигиена и санитария.* - 1986. - № 3 - С. 26 - 29.
10. Шрам Р. Дж. Цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови как метод для мониторинга уровня мутагенов в окружающей среде // *Наследственность человека и окружающая среда.* - М.: Наука – 1984 - С. 118 - 127.
11. Parry J.M., Al-Obaidly A., Al-Walhaib M. et al. Spontaneous and induced aneuploidy, considerations which may influence chromosome malsegregation // *Mut. Res.* - 2002. - Vol. 504. - P. 119 - 129.

Поступила в редакцию 28.02.05,  
после доработки – 28.03.05.

**42 ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПРОЯВІВ НЕСТАБІЛЬНОСТІ  
ГЕНОМУ ЛЮДИНИ**

**К. С. Афанасьєва, С. Р. Рушковський, В. Ф. Безруков**

Проведено порівняльний аналіз цитогенетичних проявів нестабільності геному людини: частоти мікроядер, одинарних та подвійних фрагментів хромосом та рівня передчасного розходження хроматид. Частоту мікроядер визначали в букальному епітелії та в лімфоцитах, рівні одинарних та подвійних фрагментів, а також частоту передчасного розходження хроматид – у лімфоцитах периферійної крові. Частота мікроядер у середньому була вища в букальному епітелії, ніж в лімфоцитах, і становила  $4,01 \pm 0,23$  ‰ та  $2,58 \pm 0,23$  ‰ відповідно. Середня частота одинарних та подвійних фрагментів хромосом була  $1,73 \pm 0,23$  ‰, передчасного розходження хроматид -  $1,68 \pm 0,33$  ‰. При кореляційному аналізі не виявлено статистично значущої залежності між обраними параметрами. Отже, параметри є незалежними та повинні враховуватися в комплексі для отримання більш повної оцінки рівня нестабільності геному людини.

**42 COMPARATIVE ANALYSIS OF CYTOGENETIC MANIFESTATIONS OF HUMAN GENOME  
INSTABILITY**

**K. S. Aphanasieva, S. R. Rushkovsky, V. F. Bezrukov**

The comparative analysis of cytogenetic manifestations of human genome instability was carried out. The studied parameters are the micronuclei rate (MNR), the level of single and double chromosome fragment and the level of premature chromatid division (PCD). PCD and chromosome fragments were chosen as anomalies that possibly result in MN formation. We analysed the MNR in buccal epithelium (BE) and peripheral blood lymphocytes (PBL), the level of single and double chromosome fragment as well as level PCD – in PBL only. Average MNR in BE was higher than in PBL and they  $4,01 \pm 0,23$  ‰ and  $2,58 \pm 0,23$  ‰ respectively. Average level of single and double chromosome fragment was  $1,73 \pm 0,23$  ‰, PCD -  $1,68 \pm 0,33$  ‰. The correlation analysis did not reveal statistically significant correlation of selected parameters. Thus, the studied parameters are independent ones and have to be considered altogether for more comprehensive evaluation of the level and peculiarities of manifestation of human genome instability.