

© Кочерга З.Р., 2014
УДК: 576.316 +613.952 +504.054

АССОЦИИ АКРОЦЕНТРИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ У НОВОРОЖДЕННЫХ С ЗАДЕРЖКОЙ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ РАЙОНОВ ПРИКАРПАТЬЯ

З.Р. Кочерга

Государственное высшее учебное заведение
«Ивано-Франковский национальный медицинский университет»,
г. Ивано-Франковск, Украина

Для определения частоты ассоциаций акроцентрических хромосом новорожденных Прикарпатья проведен анализ пуповинной крови 174 здоровых новорожденных и 152 новорожденных с задержкой внутриутробного развития из разных экологических районов Ивано-Франковской области. Частота ассоциаций акроцентрических хромосом у новорожденных с синдромом задержки внутриутробного развития в исследуемых экологических зонах была выше на 3,91, 3,0 и 2,07%, чем у здоровых новорожденных в зоне экологического комфорта, химического и радиационного загрязнения соответственно. Анализ среднего количества ассоциаций акроцентрических хромосом в одной клетке обнаружил тенденцию к увеличению данного показателя во всех исследуемых регионах у новорожденных с задержкой внутриутробного развития по сравнению с таковым у здоровых новорожденных.

Ключевые слова: ассоциации акроцентрических хромосом, хромосомные aberrации, новорожденные, задержка внутриутробного развития.

В связи с увеличением техногенного загрязнения окружающей среды в цитогенетике человека все большее значение приобретает изучение хромосомных и геномных мутаций, возникновение которых связывают с влиянием радионуклидов и химических веществ [6]. Достигнутые успехи при изучении генома человека позволили расшифровать последовательность нуклеотидов ДНК, установить количество генов, их структуру. Вместе с тем остается актуальным вопрос определения механизмов реализации генетической информации, их регуляции [8]. Именно этому направлению функциональной геномики посвящены современные исследования состояния хроматина интерфазных ядер, ядрышкового аппарата и ядрышкообразующих районов акроцентрических хромосом [1, 4]. Классические работы по цитогенетике доказали, что короткие плечи акроцентрических хро-

мосом представлены гетерохроматиновыми районами [9]. Они образованы тремя участками: 1) коротким сегментом, прилегающим непосредственно к центромере; 2) нитью – вторичной перетяжкой короткого плеча; 3) маленьким компактным тельцем – спутником, который содержит теломер короткого плеча акроцентрической хромосомы. Ассоциации акроцентрических хромосом (ААХ) связаны с привлечением перетяжек (районов спутниковых нитей, формирующих ядрышко). Благодаря гомологическим локусам гетерохроматиновых районов этих хромосом происходит их конъюгация, которая предопределяет и стимулирует ассоциации акроцентриков. Учитывая, что в гетерохроматиновых районах локализуются ядрышковые организаторы с генами 28 s и 18 s рибосомной РНК, изменения ААХ могут коррелировать с активностью метаболизма клетки.

Исследованию закономерностей образования ассоциаций акроцентрических хромосом (ААХ) человека посвящено много работ [3, 5, 12-13]. Были изучены количество и групповая принадлежность ассоциированных хромосом, явления ассоциаций акроцентриков со специфическими районами других хромосом. Изменчивость частоты ААХ приводит к нарушению иммунологического статуса организма и коррелирует с частотой хромосомных aberrаций. В современной перинатологии важнейшей проблемой является установление факторов риска и патогенетических механизмов гипоксии плода, пренатальной диагностики синдрома задержки внутриутробного развития (ЗВУР), которые обуславливают наиболее весомые перинатальные последствия заболевания [7].

Для оценки учета цитогенетических аномалий в формировании этих патологиче-

ских состояний, необходимо глубокое изучение индивидуальной и внутригрупповой изменчивости наследственного аппарата.

Учитывая вышесказанное, целью работы было установление частоты ассоциаций акроцентрических хромосом у здоровых новорожденных и новорожденных со ЗВУР из разных экологических регионов Прикарпатья.

Материалы и методы

Распределение территорий Ивано-Франковской области на экологические зоны проводилось на основании экологического паспорта области, данных исследований экологического состояния Украины [11]. Материалом для исследования была пуповинная кровь 174 здоровых новорожденных и 152 новорожденных с задержкой внутриутробного развития из разных районов Ивано-Франковской области (табл. 1).

Таблица 1

Распределение новорожденных Ивано-Франковской области в зависимости от экологических условий проживания

Исследуемые группы	Экологические зоны		
	Экологического комфорта, n = 119	Химического загрязнения, n = 110	Радиационного загрязнения, n = 97
Здоровые новорожденные, n = 174	54	62	58
Новорожденные со ЗВУР, n = 152	65	48	39

Проведение цитогенетического анализа новорожденных базировалось на исследовании кариотипа лимфоцитов пуповинной крови. Материал забирали стерильными шприцами с добавлением 0,01 мл гепарина, помещали в сумку-термос ($t = 5-7\text{ }^{\circ}\text{C}$) и в течение 1-2 часов доставляли в аккредитованную генетическую лабораторию ГБУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет». Культивирование лимфоцитов и приготовления препаратов хромосом проводилось с помощью реактивов РВ МАХ фирмы Gibco по методическим рекомендациям, утвержденным МЗ Украины [2]. Окраску метафазных пластинок осуществляли GTG-методом. Исследование изготовленных препаратов проводили на оптико-электронном комплексе «Метаскан-2».

Анализировали метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом. От каждого ребенка проанализированы не менее 30 метафазных пластинок, на которых идентифицировали количество ААХ. Учитывалась специфичность размещения акроцентричных хромосом в метафазе: отсутствие наложения хромосом, короткие плечи акроцентриков ориентированные друг к другу и расстояние между ними без учета спутников (сателлитов) не превышает размера длинного плеча хромосомы из группы G, большее расстояние принималось за ассоциацию, если акроцентрики были связаны видимыми нитями или лежали на одной хромосомной оси [10]. Вычисляли ассоциативный индекс как отношение количества клеток с ассоциациями к общему количеству про-

анализированных клеток, в пересчете на 100 %. Также определили среднее число ААХ в одной клетке и среднее число хромосом в одной ассоциации. Статистический анализ различий по группам проводили используя t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Ассоциации акроцентрических хромосом изучались как маркер адаптивных возможностей и иммуногенетического статуса организма. При отсутствии половых отличий отмечены вариации частоты ААХ во всех группах исследуемых в зависимости от места жительства матерей. Следует отметить, что в лимфоцитах пуповинной крови, стимулированных митогеном фетгемагглютинином к пролиферации, определено неодинаковое количество ААХ. Средняя частота ассоциаций на клетку у здоровых новорожденных колебалась от 1,32 до 1,60. Этот показатель преобладал у здоровых новорожденных из зон химического и радиационного загрязнения соответственно в 1,16 и 1,21 раза по сравнению с таковыми из зоны экологического комфорта. При этом отмечено изменение количества ассоциированных акроцентриков в клетке, а также количества акроцентрических хромосом в ассоциации в зависимости от зоны проживания. Частота клеток с ААХ у здоровых новорожденных из зон химического и радиационного загрязнения превышала таковую у новорожденных из зоны экологического комфорта ($p < 0,05$). Отмечена тенденция к увеличению ассоциативного индекса и количества хромосом в одной ассоциации у новорожденных из неблагоприятных экологических зон по сравнению с зоной комфорта. Число ассоциированных хромосом в одной клетке было большим у новорожденных из зон химического и радиационного загрязнения соответственно в 1,64 та 1,59 раза чем у здоровых новорожденных из зоны экологического комфорта ($p < 0,05$).

Анализ ассоциаций акроцентрических хромосом в лимфоцитах пуповинной крови новорожденных с ЗВУР показал, что средняя частота ассоциаций на клетку колебалась от 1,42 до 1,66. Этот

показатель преобладал у новорожденных с ЗВУР из зон химического и радиационного загрязнения соответственно в 1,14 и 1,16 раза по сравнению с таковыми из зоны экологического комфорта. Обнаружена тенденция к увеличению частоты клеток с ААХ у новорожденных из зон химического и радиационного загрязнения по сравнению с зоной комфорта ($p < 0,05$). Ассоциативный индекс у новорожденных с ЗВУР из зон химического и радиационного загрязнения превышал таковой из зоны экологического комфорта в 1,28 и 1,35 раза соответственно ($p < 0,05$). Количество хромосом в одной ассоциации у детей с ЗВУР из зоны экологического комфорта было меньше в 1,23 и 1,3 раза по сравнению с таковым у новорожденных из зон химического и радиационного загрязнения соответственно. Количество ассоциированных хромосом в одной клетке практически не отличалось у новорожденных с ЗВУР из неблагоприятных зон, но в 1,5 раза превышало такое же из зоны экологического комфорта ($p < 0,05$).

Установлена тенденция к увеличению частоты клеток с ААХ у здоровых новорожденных и новорожденных с ЗВУР из зон с неблагоприятными экологическими условиями загрязнения по сравнению с детьми из зоны экологического комфорта. Частота ААХ у новорожденных с синдромом ЗВУР в исследуемых экологических зонах была выше чем у здоровых новорожденных в зоне экологического комфорта, химического и радиационного загрязнения на 3,91, 3,0 и 2,07 %, соответственно по сравнению с соответствующими группами здоровых новорожденных. Анализ среднего количества ААХ в одной клетке обнаружил тенденцию к увеличению данного показателя во всех исследуемых регионах у новорожденных с ЗВУР по сравнению с таковым у здоровых новорожденных. При этом отмечено изменение количества ассоциированных групп акроцентриков в клетке, а также количества акроцентрических хромосом в ассоциации (рис.).

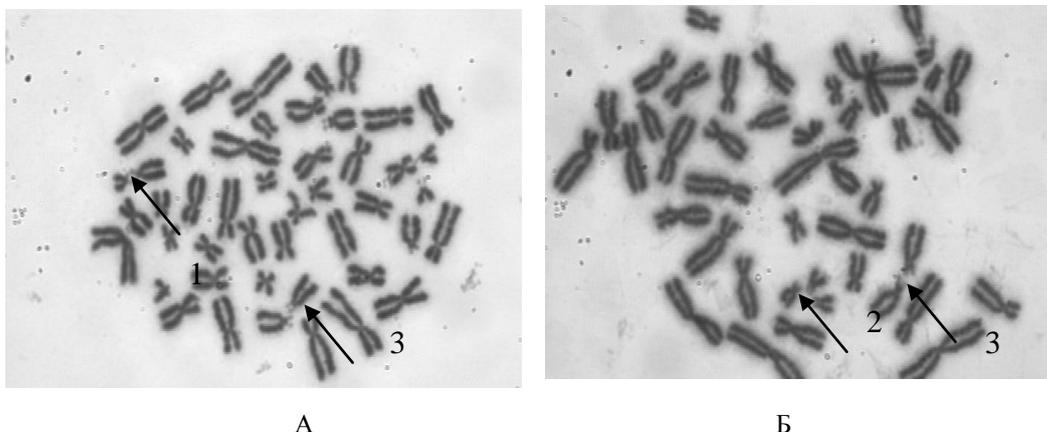


Рис. Ассоциации акроцентрических хромосом (↑) в метафазных пластинках пуповинной крови: А – здорового новорожденного ребенка М., Б – новорожденного с синдромом ЗВУР Н. из зоны с неблагоприятными экологическими условиями.
Окраска по Гимзе. Микрофотографии. Ув.: ок. 15^x, об. 90^x.
Обозначения: (↑)1 – ААХ между группами D и G; 2 – ААХ между хромосомами группы D; 3 – ААХ между хромосомами группы G

Важным фактом является то, что общее количество ассоциированных хромосом в клетке характеризует их ассоциативную способность объективнее, чем другие показатели ААХ [10]. В некоторых метафазах акроцентрические хромосомы вступали в ассоциации не только между собой, но и с прицентромерными участками первой и второй хромосом, где размещена вторичная перетяжка. Подобную картину наблюдали другие авторы, выявляли наличие ассоциаций коротких плеч спутниковых хромосом со специфическими районами хромосом 1, 2, 9, 16 [10, 15]. Такая особенность может быть обусловлена функциями ДНК гетерохроматиновых районов и свидетельствовать в пользу конъюгационной гипотезы образования ААХ. Большие различия по этому признаку между гомологическими и негомологическими хромосомами обуславливают вариабельность ААХ. Хромосомы с длинной нитью спутника вступают в ассоциации с большей частотой, чем хромосомы с короткой спутниковой нитью. Хромосомы, имеющие короткие ядрышковые перетяжки, делецию корот-

кого плеча, не содержат вторичной перетяжки и редко участвуют в ассоциациях [5]. Из этого следует, что морфологические изменения спутниковой нити взаимосвязаны с активностью ядрышковых организаторов – количеством и активностью локализованных в нем рибосомных генов. Их делеция или инактивация сопровождаются снижением способности акроцентрических хромосом к ассоциации, что было подтверждено методом гибридизации *in situ* и методом серебряния [14]. Кроме того, эктопическая конъюгация гетерохроматиновых участков в метафазе, кроме ААХ, проявляется близким размещением гомологических хромосом, специфической группировкой некоторых негомологических хромосом, ААХ с районами вторичных перетяжек хромосом 1, 2, 16, 9 и с теломерами других хромосом.

Следующим этапом работы было исследование ассоциативной способности хромосом в зависимости от их групповой принадлежности. В каждой группе наибольшую способность к ассоциациям имели хромосомы 21 (22,11 %), 13 (21,62

%) и 14 (20,96 %), наименьшую – хромосомы 15 (18,04 %) и 22 (17,27 %). Стоит отметить, что количество ассоциированных хромосом группы D превышала таковую группы G. При анализе особенностей формирования парных ассоциаций среди хромосом группы D достоверных различий не выявлено. Среди хромосом групп DG преимущественно ассоциировали хромосомы 13 и 21. Другие хромосомы объединены с одинаковой частотой, хотя хромосома 21 чаще ассоциировала с хромосомами группы D, чем хромосома 22. Кроме того, в комбинациях хромосом группы G также отмечена большая тенденция к ассоциированию хромосомы 21 по сравнению с хромосомой 22. Последнее можно объяснить тем, что в интерфазном ядре формируются спутниковые ассоциации в течение длительного периода конъюгации гомологических локусов гетерохроматиновых районов спутниковых нитей, которые переносятся посредством митоза и регистрируются на метафазных пластинках [3]. Вероятно, гетерохроматиновые участки хромосомы 21 имеют больше гомологических локусов с хромосомами группы D, поэтому они чаще объединялись. Интересным оказался тот факт, что рост индекса D/G в группе новорожденных с ЗВУР происходил за счет увеличения ассоциативной способности хромосом группы D. Это можно объяснить только с позиций конъюгационной гипотезы. Вероятнее, ААХ с хромосомами группы G в каждом следующем делении быстрее элиминировались. При 72-часовом культивировании на препаратах встречались метафазы, которые получены менее чем от двух делений, имеющие разное количество ААХ. Поэтому идеальный вариант изучения комбинаций различных хромосом в ААХ заключается в дифференцировании с помощью 5-бромдезоксисуридина клеток, находящихся в одном делении.

Полученные результаты частоты ААХ коррелировали с показателями частоты ХА (г колебался от 0,68 до 0,84), что подтвердило негативное влияние экологических условий проживания на им-

муногенетический статус и адаптивные возможности человека.

Выводы

1. Частота ассоциаций акроцентрических хромосом у новорожденных с синдромом задержки внутриутробного развития в исследуемых экологических зонах была выше на 3,91, 3,0 и 2,07 %, чем у здоровых новорожденных в зоне экологического комфорта, химического и радиационного загрязнения соответственно.

2. Анализ среднего количества ассоциаций акроцентрических хромосом в одной клетке обнаружил тенденцию к увеличению данного показателя во всех исследуемых регионах у новорожденных с задержкой внутриутробного развития по сравнению с таковым у здоровых новорожденных.

Литература

1. Гвоздев В.А. Гетерохроматин и его функциональные характеристики / В.А. Гвоздев, Л.А. Усакин, Г.Л. Коган // Медицинская генетика. – 2003. – №7. – С. 290-296.
2. Зерова-Любимова Т.Е. Цитогенетические методы исследования хромосом человека: методические рекомендации / Т.Е. Зерова-Любимова, Н.Г. Горюченко. – Киев, 2003. – 24 с.
3. Зинченко Л.И. Частота и распределение ассоциаций акроцентрических хромосом в лимфоцитах человека / Л.И. Зинченко, А.Р. Круминь, И.А. Вевере // Цитология и генетика. – 1986. – Т.20, №2. – С. 102-106.
4. Исакова Л.М. Структурно-функциональные особенности ядрышкообразующих районов интерфазных ядер клеток при гемобластозах / Л.М. Исакова, И.В. Джевадова // Цитология и генетика. – 2001. – №6. – С. 55-63.
5. Ковалева С.М. Изучение ассоциаций акроцентрических хромосом у детей / С.М. Ковалева, Т.Б. Палкина // Цитология и генетика. – 1980. – №2. – С. 64-67.
6. Кузьмина Н.С. Экспрессирование генетической нестабильности в лимфоцитах детей, проживающих в условиях длительного действия радиационного фактора / Н.С. Кузьмина, И.И. Сусков

- // Радиация. биология. радиоэкология. – 2000. – Т. 40, №5. – С. 615-620.
7. Макаров О.В. Синдром задержки развития плода: современные подходы к фармакотерапии / О.В. Макаров, П.В. Козлов, Д.В. Насырова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2003. – №6. – С. 18-22.
 8. Назаренко С.А. Эпигенетические модификации генома и болезни человека / С.А. Назаренко // Мед. генетика. – 2004. – Т. 3, №2. – С. 70-77.
 9. Ньюсбаум Роберт Л. Медицинская генетика / Роберт Л. Ньюсбаум, Родерик Р. Мак-Иннес, Хантингтон Ф. Виллард; под ред. Н.П. Бочкова. – М.: Геотар-Медиа, 2010. – 620 с.
 10. Фролов А.К. Иммуноцитогенетика / А.К. Фролов, Н.Г. Арцимович, А.А. Сохин. – М.: Медицина, 1993. – 239 с.
 11. Экологический паспорт Ивано-Франковской области. – Электрон. дан. – Режим доступа: (<http://www.menr.gov.ua/content/article/5982>).
 12. Centrometric association of a microchromosome, a new category of non-random arrangement of metaphase chromosomes / M. Schmid [et al.] // Hum Genet. – 2009. – Vol. 81, №2. – P. 127-136.
 13. Gutierrez C.E. Activity satellite association and polymorphism of Ag stained nucleolus organizer regions (Ag +NORs) in lymphocytes from women with cervical uterine cancer / C. Gutierrez E., Reyna Hinojosa R., S. Cudish J. // Arch. Med. Res. – 2007. – Vol. 28, №1. – P. 19-23.
 14. Jalperin-Lemaitre M. Comparison of acrocentric association in male and female cells: Relationship to the active nucleolar organizers / M. Jalperin-Lemaitre, I. Henks, B. Sell // Hum. Genet. – 2010. – Vol. 54. – P. 349-353.
 15. Scarpato R. Acrocentric chromosome frequency in spontaneous human lymphocyte micronuclei, evaluated by dual-color hybridization, is neither sex- nor age-related / R. Scarpato, E. Landini, L. Migliore // Mut. Res. – 2006. – Vol. 372, № 2. – P. 195-204.

ASSOCIATIONS OF ACROCENTRIC CHROMOSOMES IN SMALL-FOR-DATE NEWBORNS FROM DIFFERENT ECOLOGICAL ZONES OF PRECARPATHIA

Z.R. Kocherha

The analysis of umbilical cord blood of 174 healthy newborns and 152 small-for-date newborns from different ecological districts of Ivano-Frankovsk region has been performed in order to evaluate the rate of associations of acrocentric chromosomes in neonates from Precarpathian Ukraine. The rate of associations of acrocentric chromosomes in newborns with intra-uterine growth retardation syndrome from the investigated ecological zones was 3,91; 3,0 and 2,07% higher than in healthy newborns from zones of ecological comfort, chemically polluted territories and zones of radiation contamination consequently. The analysis of the average number of associations of acrocentric chromosomes within one cell showed the tendency to the increase of the actual rate in small-for-date newborns from all the investigated zones as compared to its rate in healthy newborns.

Keywords: associations of acrocentric chromosomes, chromosomal aberrations, newborns, intra-uterine growth retardation.

Кочерга Зоряна Ростиславовна – канд. мед. наук, доц. кафедры педиатрии ГБУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет».

E-mail: zory72@mail.ru.