

ISSN 1999-9127

Государственное научное учреждение
**«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

**СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ
ТОМ 10**

Издается с 2005 года
Выходит два раза в год

Минск
2009

УДК [577.21 + 575] (082)

Редакционная коллегия:

А.В. Кильчевский — главный редактор, Л.В. Хотылева — зам. главного редактора;
К.У. Вильчук, С.И. Гриб, О.Г. Давыденко, А.Н. Евтушенко, А.П. Ермишин,
М.А. Кадыров, Н.В. Казаровец, Н.А. Картель, А.И. Ковалевич, Г.И. Лазюк,
В.А. Лемеш, С.А. Лихачев, Н.П. Максимова, С.Б. Мельнов, М.Е. Михайлова,
И.Б. Моссэ, М.Е. Никифоров, В.Е. Падутов, В.Н. Решетников, Е.А. Сычева,
В.В. Титок, И.П. Шейко, О.Н. Харкевич — члены редколлегии;
И.В. Широкая — ответственный секретарь.

Рецензенты:

Л.В. Хотылева, академик, д.б.н., проф.,
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»;
Н.А Картель, академик д.б.н., проф.,
ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»;
С.И. Гриб, академик д.с.-х.н., проф.,
РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

М75 Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редколл.: А.В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. — Минск: Право и экономика, 2008. — 175 с. — ISBN 978-985-442-581-8.

В сборнике научных трудов публикуются обзорные и экспериментальные статьи в области молекулярной и прикладной генетики растений, микроорганизмов, животных, человека, отражающие исследования генетических процессов на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях. Особое внимание уделяется наиболее актуальным проблемам геномики, генетической и клеточной инженерии. Публикуются результаты изучения генетических основ селекции растений, животных и микроорганизмов, разработки эффективных биотехнологий для сельского хозяйства, здравоохранения, охраны окружающей среды, биобезопасности.

Текущий выпуск сборника посвящен, в частности, вопросам использования эффекта гетерозиса как средства повышения потенциала продуктивности сельскохозяйственных культур; ряд статей содержит обширный исследовательский материал, объясняющий генетическую основу гетерозиса.

Сборник предназначен для специалистов, работающих в области генетики, преподавателей, аспирантов и студентов ВУЗов биологического, сельскохозяйственного и медицинского профиля.

УДК [577.21 + 575] (082)
ISSN 1999-9127

ISBN 978-985-442-581-8

© ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси», 2009

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Е.Ю. Иванцова, А.В. Кильчевский</i> Корреляционный анализ признаков урожайности, лежкости и виохимического состава плодов томата (<i>Lycopersicon esculentum mill</i>)	7
<i>О.И. Зайцева, В.А. Лемеш, Г.В. Мозгова, А.В. Кильчевский</i> Изменения в хлоропластном геноме альбиносных растений ярового тритикале, полученных в культуре пыльников <i>in vitro</i>	13
<i>Н.Н. Петрова, С.В. Егоров</i> Уточнение метода ортогонального анализа в селекции растений	20
<i>А.Н. Перебитюк, Л.Н. Конюшкевич, Г.В. Машиковская, В.Н. Пучко</i> Оценка влияния фитотоксичных псевдомонад на развитие сахарной свеклы различных генотипов	30
<i>Л.В. Милько, А.М. Свирцевская, А.В. Кильчевский</i> Оценка полиморфизма ДНК гиногенетических линий и сорта Белорусская односемянная 69 сахарной свеклы (<i>Beta vulgaris L.</i>) с помощью RAPD-маркеров	39
<i>Н.И. Дубовец, Е.А. Сычева, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Е.Б. Бондаревич</i> Взаимодействие базового и рекомбинантного геномов в ходе формирования и функционирования генома тетраплоидных тритикале	48
<i>О. М. Люсигов, И.А. Гордей</i> Цитогенетические факторы и механизмы формирования гамет различного хромосомного состава у ржано-тритикальных гибридов F ₁ (RRABR, 5x=35)	58
<i>В.Е. Шимко, И.А. Гордей</i> Генетические основы создания и использования самофертильных линий озимой ржи в селекции на гетерозис	69
<i>А.Д. Политыко, О.М. Хурс, Т. Лир</i> Геномные болезни человека. Анализ локуса 22q11	80
<i>О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, В.Д. Трусова, С.Н. Шевцова, Н.А. Балащенко, А.С. Сапун, С.Е. Дромашко</i> Разработка методов компьютерной видеомикроскопии живых клеток для медицинской трансплантологии, биотехнологии животных и токсикологии	89
<i>Н.И. Рябокоть, Н.В. Никитченко, Р.И. Гончарова</i> Стимуляция репарации окислительных повреждений ДНК в лимфоцитах человека <i>in vitro</i> с использованием одного из перспективных производных 1,4-дигидропирина	101
<i>Н.В. Савина, М.П. Смаль, Т.Д. Кужир, А.А. Ершова-Павлова, Н.П. Кудрейко, И.Г. Першин, В.С. Савочкин, Л.П. Юревич, Р.И. Гончарова</i> Метод ДНК-комет в выявлении геномной нестабильности. Мониторинг состояния генома у работников ОАО «МАЗ»	108

<i>С.В. Дубовик, Н.Б. Гусина</i> Применение метода прямого секвенирования для определения редких мутаций гена ATR7B у белорусских пациентов с болезнью Коновалова-Вильсона	114
<i>Н.В. Савина, О.В. Даливеля, М.П. Смаль, Т.Д. Кужжир, М. Воеводска, И. Бурачевска, И. Градска, Р.И. Гончарова</i> Радиопротекторная активность антимутагена дигидропиридинового ряда в зависимости от генотипа клеток млекопитающих	119
<i>Л.Н. Кострова, Д.А. Ушакова, И.П. Аношенко</i> Цитогенетические эффекты углеродных наночастиц в клетках костного мозга мышей	131
<i>Т.В. Осадчук, К.А. Моссэ, Н.В. Румянцева</i> Определение экспансии СТG-повторов в гене DMPK у пациентов с миотонической дистрофией 1 типа	136
<i>Т.В. Осадчук, К.А. Моссэ, Н.В. Румянцева</i> Идентификация дупликации гена рmr22 у пациентов с невральнoй амиотрофией шарко-мари-гус	142
<i>Д.В. Галиновский, А.Н. Евтушенков</i> Эффект повышенной дозы генов CRT-кластера в продукции каротиноидных пигментов штаммами <i>Pantoea agglomerans</i>	147
<i>С.О. Мясников, Н.Б. Гусина, И.В. Наумчик, Р.Д. Хмель, Н.В. Румянцева</i> ДНК-диагностика мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера в Беларуси: анализ делеций экзонов гена DMD	155
<i>Н.Н. Чакова, Е.П. Михаленко, Э.В. Крупнова, Н.В. Чеботарева, С.С. Кругленко, С.Ф. Золотухина, А.В. Ковкова</i> Генетический полиморфизм ферментов метаболизма лекарственных средств (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, GST, NAT2 И MDR1) у жителей Беларуси	161
<i>О.М. Хурс, А.Д. Политыко, Н.В. Румянцева, Л.В. Исакович, В.Д. Кулак, Т.М. Егорова, И.В. Наумчик</i> Синдром Вильямса в Беларуси: молекулярно-цитогенетическое исследование и характеристика variability фенотипических признаков	170
Рефераты	177
Правила для авторов	186

CONTENTS

<i>E. Ivantsova, A. Kilchevsky</i> Correlation analysis of tomato-fruit (<i>Lycopersicon esculentum</i> mill) yield traits, term-storage and biochemical features.	7
<i>O. Zaitseva, V. Lemesh, G. Mozgova, A. Kilchevsky</i> Changes in chloroplast genome of spring triticales albino plants produced in the <i>in vitro</i> anther culture	13
<i>N. Petrova, S. Egorov.</i> Precise definition of the orthogonal analysis method in breeding of plants.....	20
<i>A. Perebityuk, L. Konyushkevich, G. Mashkovskaya, V. Puchko</i> Estimation of Phytotoxic Pseudomonade Effect on Development of Sugar Beet of Different Genotypes.....	30
<i>V. Milko, A. Svirshchevskaya, A. Kilchevsky.</i> Assessment of DNA polymorphism in gynogenetic lines and cultivar Belorusskaya odnosemyannaya 69 of sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) with RAPD markers.....	39
<i>N. Dubovec, A. Sycheva, L. Solovey, T. Shtyk, Y. Bondarevich</i> Interaction of basic and recombinant genomes during formation and functioning of tetraploid triticales genome.....	48
<i>O. Lyusikov, I. Gordey</i> Cytogenetic factors and mechanisms of gamete formation with different chromosome composition in rye-triticales hybrids fl (rrabr, 5x=35)	58
<i>V. Shymko, I. Gordei</i> Genetic principles of developing and using self-fertile lines of winter rye in breeding for heterosis	69
<i>A. Polityko, O. Khurs, Thomas Liehr.</i> Human genomic disorders. Analysis of locus 22q11	80
<i>O. Kvitko, I. Koneva, Y. Sheiko, V. Trusova, S. Shevtsova, A. Sapun, S. Dromashko</i> Elaboration of computer videomicroscopy methods of living cells for medical transplantology, animal biotechnology and toxicology	89
<i>N. Ryabokon, N. Nikitchenko, R. Goncharova</i> Stimulation of repair of oxidative dna damage in human lymphocytes <i>in vitro</i> with one of the promising derivatives of 1,4-dihydropyridine.....	101
<i>N. Savina, M. Smal, T. Kuzhir, A. Ershova-Pavlova, N. Kudreiko, I. Pershin, V. Savochkin, L. Yurevich, R. Goncharova</i> The Comet-assay in revealing genom instability. Monitoring of the genome status in workers of AOA MAZ.....	108

<i>S. Dubovick, N. Gusina</i> Detection of <i>atp7b</i> gene mutations by direct sequencing in Belarusian patients with Wilson disease.....	114
<i>N. Savina, O. Dalivelya, M. Smal, T. Kuzhir, M. Woewodska, I. Gradska, I. Buraczewska, R. Goncharova</i> Radioprotective activity of the antimutagen of 1,4-dihydropyridine series depending on genotype of mammalian cells.....	119
<i>L. Kostrova, D. Ushakova, I. Anoshenko</i> Cytogenetic effects of carbon nanoparticles in bone marrow cells of mice.....	131
<i>T. Osadchuk, K. Mosse, N. Rumyantseva</i> Determination of the expansion of CTG-repeats in DMPK gene in the patients with myotonic dystrophy of type 1.....	136
<i>T. Osadchuk, K. Mosse, N. Rumyantseva</i> Identification of <i>pmp22</i> gene duplication in patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy ...	142
<i>D. Galinousky, A. Evtushenkov</i> The effect of the higher dose of genes from <i>crt</i> -cluster in production of carotenoids pigment in <i>pantoea agglomerans</i> strains.....	147
<i>S. Miasnikov, N. Gusina, I. Naumchik, R. Khmel, N. Rumyantseva</i> DNA diagnosis of Duchenne-Becker muscular dystrophy in Belarus: analysis of exon deletions of the <i>dmd</i> gene.....	155
<i>N. Chakova, E. Mikhalenko, E. Krupnova, N. Chebotareva, S. Kruglenko, S. Zolotukhina, A. Kovkova</i> Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes <i>cyp1a2</i> , <i>cyp2d6</i> , <i>cyp2c9</i> , <i>gst</i> , <i>nat2</i> and <i>mdr1</i> in population of Belarus.....	161
<i>O. Khurs, A. Polityko, N. Rumyantseva, L. Isakovich, V. Kulak, T. Egorova, I. Naumchik</i> Williams syndrome in Belarus: molecular-cytogenetic investigation and characterization of variability of phenotypic features.....	170
Summaries.....	177
Instructions to authors.....	186

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРИЗНАКОВ УРОЖАЙНОСТИ, ЛЕЖКОСТИ И БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПЛОДОВ ТОМАТА (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL)

¹Могилевский государственный университет им. А.Кулешова, г. Могилев, ул. Космонавтов, 1.

²Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Создание новых высокоурожайных гибридов томата для длительного хранения плодов в нерегулируемых условиях является актуальным направлением в селекции томата [1–4]. Ряд исследований выполнен по изучению корреляционных связей между количественными признаками у томата [5, 6]. Однако корреляционные связи лежкости плодов с другими хозяйственно-ценными признаками в условиях Беларуси не изучались. С учетом важности данной проблемы была поставлена задача: установить характер корреляционных

связей между лежкостью плодов томата и признаками урожайности, средней массы плода и биохимическими признаками плодов.

По мнению П.В. Терентьева [7], связь между признаками в организме проявляется в наличии корреляционных плеяд и носит групповой характер. Член плеяды, средняя корреляция которого с другими членами является наибольшей, считается признаком-индикатором. Такие признаки-индикаторы относятся к причинам, вызывающим стягивание признаков в плеяду [7].

Объекты и методы исследования

Объектом исследований послужили 7 родительских форм томата открытого грунта и 7 родительских форм тепличных томатов, различающихся по морфологическим признакам и 42 гибридные комбинации, полученные в двух схемах диаллельных скрещиваний. Испытаны гибриды и родительские формы в пленочных теплицах и открытом грунте опытного поля УО «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия».

Нами изучено наличие корреляционных плеяд по 11 количественным признакам: 1 – лежкость плодов, дни; 2 – средняя масса плода, г.; 3 – общая кислотность молочных плодов, %; 4 – общая кислотность плодов в полной сте-

пени зрелости, %; 5 – содержание сахаров в молочных плодах, %; 6 – содержание сахаров в плодах полной степени зрелости, %; 7 – содержание сухих веществ в молочных плодах, %; 8 – содержание сухих веществ в плодах полной степени зрелости, %; 9 – общая урожайность, кг/м², ц/га; 10 – товарная урожайность, кг/м², ц/га; 11 – ранняя урожайность, кг/м², ц/га.

Взаимосвязь между количественными признаками определяли методом корреляционных плеяд В.П. Терентьева [7]. Корреляции подразделяют [7] на три группы в зависимости от силы связи между признаками: слабые ($r=0,01-0,30$), средние ($r=0,31-0,60$), сильные ($r=0,61-1$).

Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 представлены корреляционные связи между признаками 28 тепличных генотипов в 2002-2003 годах. Лежкость плодов (1) находится в тесной отрицательной корреляционной связи с ранней урожайностью (11).

Значит, плоды раннеспелых форм томата являются менее лежкими. Общую (9) и товарную урожайность (10) объединяет сильная положительная корреляционная связь на протяжении двух лет исследований.

Отмечается ослабление некоторых сильных корреляций в 2003 г. Например, связь между признаками содержания сухих веществ в плодах молочной (7) и полной (8) степени зрелости из разряда сильных перешла в среднюю с тем же знаком (положительная). А корреляционная связь между признаками «содержание сахаров» (6) и «содержание сухих веществ в плодах полной степени зрелости» (8) изменилась с сильной положительной на слабую.

Из группы средних по силе корреляционных связей следует выделить в течение двух лет исследований отрицательную связь между лежкостью плодов (1) и содержанием сахаров в молочных (5) плодах. Средняя положительная корреляционная связь выявлена в течение двух лет между содержанием сахаров в плодах полной степени зрелости (6) и содержанием сухих веществ в молочных плодах (7). В 2002 году ранняя урожайность (11) связана отрицательными корреляционными связями с общей кислотностью (4) и содержанием сухих веществ в плодах полной степени зрелости (8). Отсюда можно сделать вывод, что плоды раннеспелых форм имеют более низкую кислотность и меньшее количество сухих веществ.

Плеяда из признаков: «содержание сахаров в молочных плодах» (5), «содержание сахаров в плодах полной степени зрелости» (6), «содержание сухих веществ в молочных плодах» (7), «содержание сухих веществ в плодах полной степени зрелости» (8) повторилась и в 2003 году. В ней по-прежнему признаком-индикатором является «содержание сахаров в молочных плодах томата» (5), который связан с вышеперечисленными признаками средними положительными корреляциями.

В 2002 г. выявлена средняя отрицательная корреляция между содержанием сухих веществ в плодах полной степени зрелости (8), общей (9) и товарной (10) урожайностями. Из положительных средних в 2002 г. в разряд слабых в 2003 г. попали корреляции между лежкостью плодов (1) и общей кислотностью в молочных (3), и плодах полной степени зрелости (4).

Корреляция иногда меняет не только силу, но и направление. Так, слабая отрицательная корреляция в 2002 г. между ранней урожайностью (11) и средней массой плода (2) перешла в среднюю положительную в 2003 г.

В 2002 г. лежкость плодов (1) слабыми поло-

жительными корреляциями связана со следующими признаками: «средняя масса плода» (2), «содержание сахаров в плодах полной степени зрелости» (6), «содержание сухих веществ в молочных плодах» (7), «содержание сухих веществ в плодах полной степени зрелости» (8), «товарная урожайность» (10). А в 2003 г. между лежкостью плодов (1) и признаками 2, 6, 10 слабые связи изменили направление на отрицательное. В течение двух лет между лежкостью плодов (1) и общей урожайностью (9) выявлена слабая отрицательная корреляционная связь.

На рисунке 2 представлены корреляционные связи между признаками у родителей и гибридов F1 диаллельной схемы, выращенных в условиях открытого грунта. В 2002 г. были проанализированы 11 признаков, в 2003 – 10 признаков, т.к. ранний урожай изучаемые образцы не сформировали.

В 2002 г. нами установлено наличие сильной положительной связи между признаками: «содержание сахаров в плодах полной степени зрелости» (6), «содержание сухих веществ в молочных плодах» (7) и «содержание сухих веществ в плодах полной степени зрелости» (8). В 2003 г. эти связи перешли в разряд слабых с тем же знаком.

Сильная положительная связь выявлена в 2002 г. между общей (9) и товарной (10) урожайностью (в 2003 г. она перешла в разряд средней); между содержанием общей кислотности в молочных плодах (3) и в плодах полной степени зрелости (4), а также между содержанием сахаров (5) и содержанием сухих веществ (7) в плодах молочной степени зрелости. В 2003 г. связи между признаками (3) и (4), (5) и (7) стали слабыми.

Анализ корреляций между изучаемыми признаками показал, что в 2003 г. сильная степень зависимости между изученными признаками отсутствует.

Из группы средних по силе корреляционных связей следует выделить в 2002 г. отрицательную связь между лежкостью плодов (1) и ранней урожайностью (11) и положительную связь между лежкостью плодов (1) и кислотностью молочных плодов (3). В 2002 г. признак «общая урожайность» (9) положительно связан с средней массой плода (2) и отрицательно связан с такими признаками как «содержание

кислотности в молочных плодах» (3), «содержание кислотности в плодах полной степени зрелости» (4) и «содержание сухих веществ в молочных плодах» (7). В данной плеяде признаком-индикатором является общая урожайность, эта плеяда выявлена и в 2003 г., но среди слабых корреляций. Товарная урожайность (10) находится в слабой отрицательной связи с содержанием сухих веществ в молочных плодах (7) и плодах полной степени зрелости (8) в 2002 г. В течение двух лет отмечена средняя положительная корреляция между содержанием сахаров в молочных плодах (5) и содержанием сухих веществ в плодах полной степени зрелости (8).

В 2003 г. средняя отрицательная связь отме-

чена между содержанием общей кислотности в молочных плодах (3) и содержанием сахаров в плодах полной степени зрелости (6), т.е. по сравнению с 2002 г. эта корреляция изменила не только направление, но и силу действия (была слабой).

Среди слабых связей особый интерес представляют отрицательная – между лежкостью плодов (1) и их средней массой (2), положительные – между лежкостью плодов (1) и признаками 4, 5, 6, 7, 8, определяющими биохимический состав плодов. Следует отметить, что признаки урожайности (9, 10, 11) связаны отрицательными слабыми корреляциями с признаками, определяющими биохимический состав плодов (3, 4, 5, 6, 7, 8).

Заключение

1. Установлено варьирование коэффициентов корреляции между признаками у томата в диаллельных и топкроссных скрещиваниях в зависимости от условий выращивания.

2. У тепличных форм томата в диаллельных скрещиваниях выявлена сильная отрицательная корреляционная связь между лежкостью плодов и ранней урожайностью; тесная положительная – между содержанием сухих веществ в плодах молочной и полной степени зрелости.

Установлена средняя корреляционная отрицательная связь между лежкостью плодов и содержанием сахаров в плодах молочной степени зрелости. Значит, плоды томата молочной степени зрелости с более низким содержанием сахаров способны к более длительному периоду хранения.

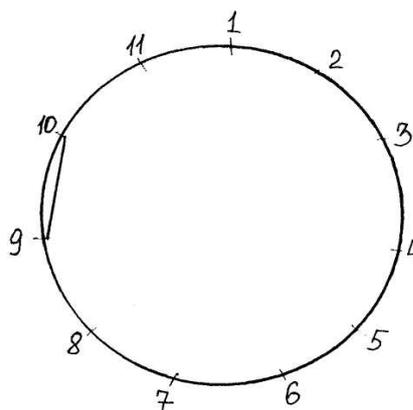
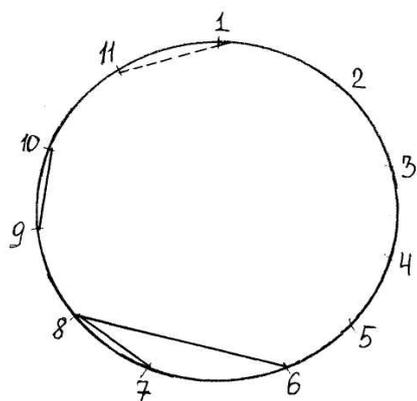
Выявлена корреляционная плеяда, признаком-индикатором которой является «содержание сахаров в плодах молочной степени зрелости». У этого признака положительные

корреляции отмечены с содержанием сахаров в плодах полной степени зрелости, с содержанием сухих веществ в плодах молочной и полной степени зрелости.

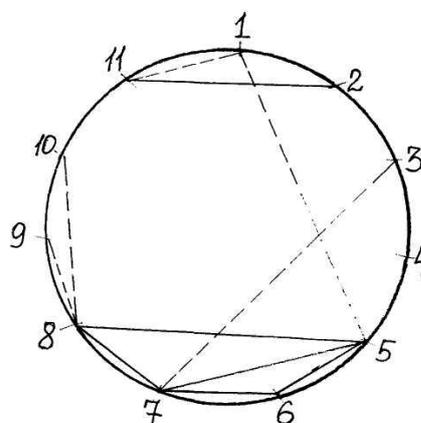
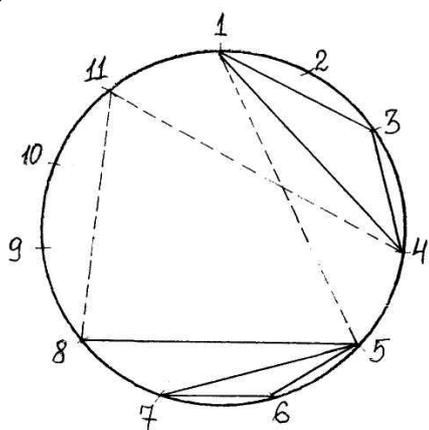
3. У форм томата открытого грунта в диаллельных скрещиваниях выявлена сильная положительная корреляционная связь между общей и товарной урожайностью, между содержанием сахаров и содержанием сухих веществ в плодах томата.

Установлена средняя отрицательная корреляция между лежкостью плодов и ранней урожайностью, и положительная – между лежкостью плодов и кислотностью в молочных плодах томата.

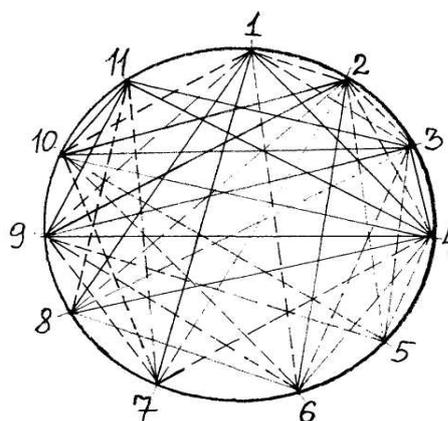
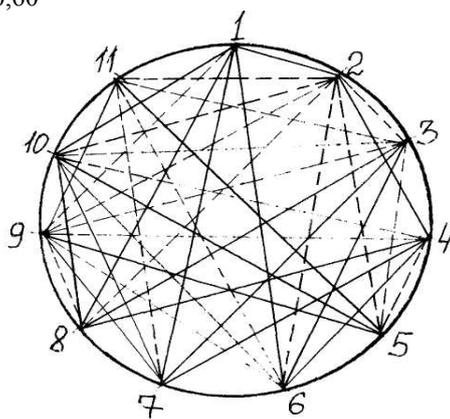
В 2002 г. выявлена средняя отрицательная связь между общей урожайностью и кислотностью, содержанием сухих веществ в плодах томата, а также положительная связь с средней массой плода.



$r = 0,61 - 1,0$



$r = 0,31 - 0,60$



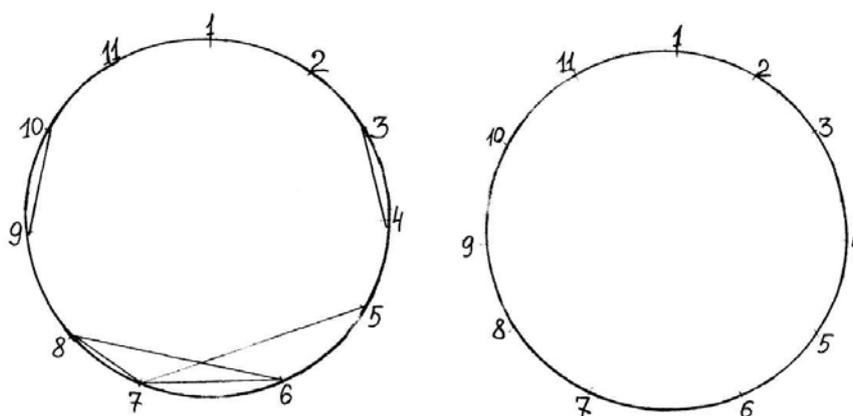
2002 год

$r = 0,01 - 0,30$

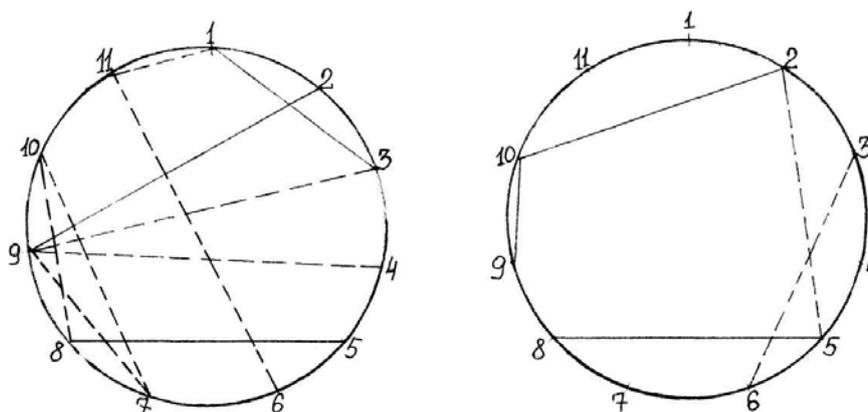
2003 год

1 – лежкость плодов, дни; 2 – средняя масса плода, г; 3 – содержание общей кислотности в молочных плодах, %; 4 – содержание общей кислотности в плодах полной степени зрелости, %; 5 – содержание сахаров в молочных плодах, %; 6 – содержание сахаров в плодах полной степени зрелости, %; 7 – содержание сухих веществ в молочных плодах, %; 8 – содержание сухих веществ в плодах полной степени зрелости, %; 9 – общая урожайность, кг/м²; 10 – товарная урожайность, кг/м²; 11 – ранняя урожайность, кг/м². Положительные корреляции изображены сплошными линиями, отрицательные – пунктирными.

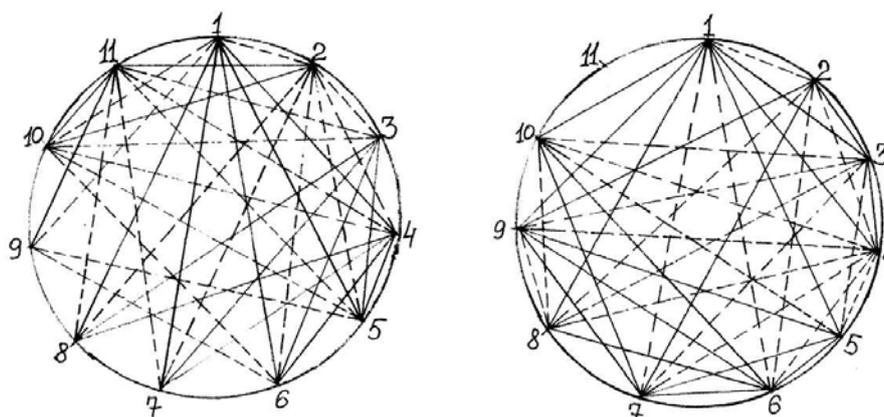
Рис. 1. Корреляционные связи между признаками тепличных форм томата в диаллельных скрещиваниях.



$r = 61 - 1.00$



$r = 0.31 - 0.60$



2002 год

$r = 0.01 - 0.30$

2003 год

1 – лежкость плодов, дни; 2 – средняя масса плода, г; 3 – содержание общей кислотности в молочных плодах, %; 4 – содержание общей кислотности в зрелых плодах, %; 5 – содержание сахаров в молочных плодах, %; 6 – содержание сахаров в зрелых плодах, %; 7 – содержание сухих веществ в молочных плодах, %; 8 – содержание сухих веществ в зрелых плодах, %; 9 – общая урожайность, ц/га; 10 – товарная урожайность, ц/га; 11 – ранняя урожайность, ц/га. Положительные корреляции на рисунках изображены сплошными линиями, отрицательные – пунктирными.

Рис. 2. Корреляционные связи между признаками томата открытого грунта в диаллельных скрещиваниях.

Список использованных источников

1. Гавриш, С.Ф. Новые направления в селекции томата для защищенного грунта / С.Ф. Гавриш // Селекция и семеноводство овощных культур в 21 веке: материалы междунар. науч.-практ. конф. ТСХА. – М. – 2000. – Том 1., С. 176-177.
2. Еременко, В.В. Пути удлинения периода потребления свежих плодов томата / В.В. Еременко, В.А. Кравченко, А.В. Куземенский // Овощеводство – состояние, проблемы, перспективы: сб. науч. тр. к 70-летию ВНИИО. – М.: ВНИИО. – 2001. – Том 2. – С. 82-84.
3. Кондратьева, И.Ю. Сорты томата с высокой лежкостью плодов / И.Ю. Кондратьева // Картофель и овощи. – 2000. – №3. – 9 с.
4. Куземенский, А.В. Селекционно-генетические исследования мутантных форм томата / А.В. Куземенский. – Харьков. – 2004. – 17 с.
5. Андреева, Е.Н. Коэффициент корреляции и наследование массы цветка, плода и семян у томата / Е.Н. Андреева, С.Л. Назина // Роль абиотических факторов в селекции и технологии овощных культур. – М., 1989. – С. 99-106.
6. Коготько, Л.Г. Изучение корреляционных связей между количественными признаками у томата открытого грунта в диалельных скрещиваниях / Л.Г. Коготько // Интенсивное плодовоовощеводство: сб. науч. тр. – Горки, 2003. – С. 31-38.
7. Терентьев, В.П. Метод корреляционных плеяд / В.П. Терентьев // Вестн. Ленингр. ун-та. – 1959. – №9. – С. 137-141.

О.И. Зайцева, В.А. Лемеш, Г.В. Мозгова, А.В. Кильчевский

ИЗМЕНЕНИЯ В ХЛОРОПЛАСТНОМ ГЕНОМЕ АЛЬБИНОСНЫХ РАСТЕНИЙ ЯРОВОГО ТРИТИКАЛЕ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO*

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Культивирование изолированных пыльников в условиях *in vitro* является одним из наиболее перспективных современных методов при создании гаплоидных и дигаплоидных линий растений. Использование данного биотехнологического подхода позволяет получить полностью гомозиготные линии в течение одного цикла культивирования, что существенно ускоряет селекционный процесс. Главной проблемой, препятствующей широкому практическому применению культуры пыльников *in vitro* у злаков, является высокая частота формирования хлорофилл-дефектных растений, достигающая у отдельных генотипов пшеницы, ячменя, риса, тритикале и других злаков 100% [1, 2]. Известно, что на увеличение выхода зеленых растений-регенерантов влияет характер предобработки, состав питательных сред, условия культивирования. Однако на сегодняшний день не подобрано единых условий, обеспечивающих высокую частоту формирования зеленых регенерантов у всех злаков. Поэтому важным является более детальное исследование процессов, которые приводят к андрогенетическому альбинизму.

Существует ряд гипотез о первичных причинах и механизмах возникновения альбиносного фенотипа в культуре пыльников *in vitro* [3, 4, 5]. Известно, что генотип растений – доноров пыльников оказывает достоверное влияние на выход зеленых и альбиносных растений-регенерантов [2]. Выявлено, что в культуре пыльников мягкой пшеницы сорта *Chinese Spring* геном А достоверно влияет на регенерацию зеленых растений, а геном В – на общую регенерацию и формирование альбиносных растений-регенерантов [6]. Поиск генетических маркеров, связанных с процессами регенерации

растений, позволил установить локусы количественных признаков, влияющих на число зеленых и альбиносных растений в культуре пыльников злаков [7, 8, 9, 10].

Выявлено также участие плазмогенов в контроле признаков, характеризующих пыльцевой эмбриогенез [2]. Предполагается, что одной из главных причин формирования альбиносных растений в культуре пыльников являются мутации пластидных генов, возникающие в микроспорах пыльника в ходе их культивирования или регенерации растения [4, 5]. Молекулярные исследования выявили широкий спектр перестроек, в основном делеций, в пластидном геноме альбиносных растений-регенерантов пшеницы, ячменя и риса [5, 11, 12]. Целенаправленное отключение пластидных генов табака, а именно *rpo*-генов, кодирующих пластидную РНК-полимеразу, позволило получить альбиносные растения-регенеранты в культуре пыльников [13]. Это указывает на то, что делеции пластидного генома могут приводить к образованию хлорофилл-дефектных растений. Предполагается, что основой для внутримолекулярных перестроек пластома могут служить короткие прямые повторы, АТ-богатые последовательности или псевдогены [12].

При этом исследования Wang et al. показали, что фрагментация ДНК происходит в развивающихся пыльниках, в которых микроспоры находятся на стадии средней и поздней одноядерной микроспоры. Это позволило выдвинуть предположение, что альбиносные растения *in vitro* могут происходить от микроспор, пластиды которых дифференцируются в амилопласты и постепенно дегенерируют [14].

У альбиносных растений показаны нарушения транскрипционной и трансляционной активности хлоропластного генома [4, 15]. При этом не у всех хлорофилл-дефектных растений выявляются изменения пластидной ДНК. Hofinger et al. выявили изменения транскрипции и трансляции пластома у альбиносных регенерантов как с перестройками пластидного генома, так и без них [15]. Было показано, что у растений альбино-фенотипа снижается уровень транскрипции пластидных генов фотосинтетического аппарата и рибосомальных РНК, в то время как остальные гены функционируют без изменений. Эти данные позволяют предположить, что у альбиносных растений наблюдается нехватка работающих пластидных рибосом, что приводит к нарушениям трансляции и транскрипции. Недостаток функционирующих рибосом по-видимому, обусловлен влиянием ядерного генома на процессы развития пластид.

Таким образом, существует ряд гипотез, объясняющих механизмы возникновения хлорофилл-дефектных растений в культуре пыльников *in vitro*. При этом до конца не вы-

явлена роль пластидного и ядерного геномов и их совместного действия на выход альбиносных растений в данной культуре. Вместе с тем, явление альбинизма в культуре пыльников может быть тесно связано с процессами деградации хлоропластной ДНК, которые происходят в микроспорах в ходе их естественного развития *in vivo* [3]. Поэтому перспективным направлением в изучении данной проблемы является исследование структурных перестроек ДНК, затрагивающих конкретные хлоропластные гены, связанные с процессами фотосинтеза, и поиск участков хлоропластного генома, в которых с высокой частотой могут происходить изменения, ведущие к формированию мутантного фенотипа.

Следует отметить, что установление причин альбинизма проводилось на относительно небольшом числе объектов, в основном на ячмене и пшенице [16, 17]. В связи с этим целью работы являлось изучение изменений в хлоропластном геноме альбиносных растений-регенерантов сортов, линий и гибридов ярового тритикале, полученных в культуре пыльников *in vitro*.

Материалы и методы

Объектом исследования служили альбиносные и зеленые растения-регенеранты, полученные в культуре пыльников 19 генотипов ярового тритикале, включая 5 сортов, 3 сортообразца, 7 гибридов первого поколения, 1 гибрид второго поколения, 3 гибрида третьего поколения. Культивирование пыльников проводилась в соответствии с ранее описанной методикой [18].

Для выявления изменений использовались 7 пар праймеров к 7 генам хлоропластного генома (табл. 1) [19].

ДНК выделяли по методике Дорохова и Клоке с модификациями [20]. Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2,5 мкл ПЦР-буфера (75 мМ трис-НСl, рН 8,3, 20мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 %-ный твин-20) 2мМ MgCl_2 , 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкМ каждого праймера, 1 U Taq-полимеразы и 50 нг тотальной ДНК. Амплификация проходила в термоциклере MJ mini Gradient Thermal Cyler (Bio-Rad) по ранее описанным программам [19].

Таблица 1

Исследованные пластидные гены

Название гена	Прямая и обратная последовательность праймеров (5'-3')	Продукт гена	Размер гена (п.о.)	Размер ДНК-фрагмента (п.о.)
<i>psaA</i>	CCAGAAGGTAATGGGTACTCC GCCATTTCTCAAGAACTAGC	P 700 апопротеин Ia	2252	2109
<i>atpB</i>	TTTCTGCGATTTGTTCTCCTCT GTACAGGTCGTATCGATCAAAT	β -субъединица CF ₁ - комплекса АТФ-азы	1496	1439
<i>atpE</i>	AATCCAATTGACAGCCTCGATT TGTA CTGACTCCTAAGCGAATT	ϵ -субъединица CF ₁ - комплекса АТФ-азы	413	382
<i>rbcL</i>	ACTAAAGCAGGTGTTGGATTTA ATCAATAGTATCTACCGGCTCG	Большая субъединица РБФК	1433	1410
<i>cemA</i>	GGTCTCTTCCCTCATTTAACAAA GAATGATAAATGACTACAAGCG	Белок мембраны оболочки	692	612
<i>petA</i>	CTTGGGTAAAGGAACAGATAAC GTAATGGATCCTGAAGCACGAT	Цитохром f	962	831
<i>trnE</i>	CCCTATCGTCTAGTGGTTCAGG GCTGCCTCCTTCAAAGAGAGAT	тРНК ^{glu}	72	46

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 3%-ном (ген *trnE*) и 1%-ном (остальные гены) агарозном геле.

Оценка выхода альбиносных растений проводилась в пересчете на количество изученных генотипов, а также на совокупное число всех

полученных хлорофилл-дефектных растений, так как процессы, приводящие к андрогенетическому альбинизму, по-видимому, не генотипически специфичны, а характеризуют вид в целом. Статистическая обработка данных проводилась при помощи статистического пакета MS Excel.

Результаты и обсуждение

При установлении причин и механизмов альбинизма в культуре пыльников большое внимание уделяется хлоропластному геному. Изучение пластидной ДНК альбиносных растений-регенерантов пшеницы и ячменя показало наличие делеций и перестроек 40-80% пластома по сравнению с зелеными регенерантами [15]. Альбиносные растения часто лишены хлоропластов и содержат их предшественники – пропластиды [21].

Показано, что с наибольшей частотой изменения в пластидном геноме у хлорофилл-дефектных растений, полученных путем прямого эмбриогенеза в культуре пыльников, происходят в LSC-области [11]. В данном участке расположена большая часть хлоропластных генов, кодирующих компоненты тилакоидных мембран пластид: гены фотосистем 1 и 2, цитохромного комплекса b/f, АТФ-синтазы. Ogihara et al. [22] выделили в хлоропластном геноме пшениц и эгилопсов,

выращенных в естественных условиях, так называемые «горячие» области, в значительной степени подверженные структурным мутациям. В особенности это касается участка размером 16 т.п.о., включающего гены *rbcL* и *petA*. Поскольку данный участок располагается в LSC-области хлоропластного генома, нами предполагалось, что структурные перестройки, которые могли бы быть причиной андрогенетического альбинизма, происходят в таком эволюционно нестабильном участке с наибольшей частотой. На основании этого исследования изменений ДНК альбиносных растений проводились в двух районах генома хлоропластов, с высокой частотой подверженных структурным мутациям (D и G-области по Ogihara et al.) [22]. Для анализа перестроек из первой области были выбраны пять генов, участвующих в процессе фотосинтеза: ген *rbcL*, кодирующий большую субъединицу рибулозобифосфаткарбоксилазы (РБФК), и гены

компонентов тилакоидных мембран пластид (фотосистемы 1 – *psaA*, комплекса цитохром *b/f* – *petA*, АТФ-синтазы – *atpB* и *atpE*); и один ген, кодирующий белок мембраны оболочки хлоропласта, – *cemA*.

Для оценки изменений во второй области был проанализирован ген *trnE*. Продуктом данного гена является тРНК глутаминовой кислоты (тРНК^{glu}). тРНК^{glu} принимает участие в синтезе АЛК – первого специфического предшественника всех тетрапирролов, в том числе и хлорофилла. При этом известно, что все ферменты, принимающие участие в синтезе АЛК,

закодированы в ядерном геноме, в то время как тРНК^{glu} кодируется хлоропластной ДНК [3].

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа выявлено присутствие исследуемых генов хлоропластной ДНК в листьях зеленых растений, полученных методом культуры пыльников, у всех изучаемых генотипов тритикале. В то же время шесть из семи генов пластидной ДНК не выявлялись у исследованных альбиносных растений (табл. 2). При этом перестройки наблюдались у 36 из 38 изученных альбиносных растений-регенерантов ярового тритикале.

Таблица 2

Молекулярный анализ перестроек хлоропластного генома у альбиносных растений-регенерантов тритикале

Генотип	Количество растений	Количество растений с изменениями генов						
		<i>atpB</i>	<i>petA</i>	<i>psaA</i>	<i>atpE</i>	<i>cemA</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnE</i>
(Аист х Згода) х Матейко	5	4	4	4	2	4	0	0
Мешко х Vanti	5	5	3	4	2	0	1	0
Садко	5	5	3	4	1	1	2	0
Узор х Матейко	3	3	1	3	0	0	0	0
WS-102 х Дублет	3	3	2	2	1	0	0	0
Дублет	2	2	0	2	0	0	0	0
(Аист х Полюс) х Матейко	1	0	0	0	0	0	0	0
(Лана х BOR 25115) х Лотос	1	1	0	0	0	0	0	0
(Лана х Ростань) х Лана	1	0	0	0	0	0	0	0
(Матейко х Presto) х WS-102	1	1	1	1	0	0	0	0
(Ульяна х BOR 25115) х BOR 25115	1	1	1	1	0	0	1	0
Суме х Дублет	1	1	0	1	0	0	0	0
WS-102	1	1	1	1	0	0	1	0
МАН 17569	1	0	0	1	0	1	1	0
Матейко	1	1	0	1	0	1	1	0
Мешко	1	1	0	1	0	0	1	0
Ульяна	1	1	1	0	0	0	0	0
Ульяна х Дарья	2	1	0	0	0	0	0	0
Лотас х Матейко	2	2	0	0	0	0	0	0

Наиболее часто не выявлялся ген *atpB*, кодирующий β -субъединицу CF_1 -комплекса АТФ-азы. У изученных генотипов данный ген присутствовал с частотой 5,3%, при этом он не обнаружен у 84,2% хлорофиллдефектных регенерантов (у 33 из 38 изученных растений) (Табл. 3). В свою очередь ген *petA* не детектировался у 12 генотипов (68,4%) и 17 индивидуальных растений. Ген *psaA* не обнаружен у 47,4% изученных форм и 44,7% растений-регенерантов, а ген *rbcL* – у 36,8% генотипов и 8 хлорофиллдефектных растений (21,1%). Продукты амплификации генов *atpE* и *cemA* не выявлялись у 21,1%

исследованных форм, а также у 6 (15,8%) и 7 (18,42%) альбиносных растений-регенерантов, соответственно. Ген *trnE* детектировался у всех изученных растений. Таким образом, результаты анализа изменений хлоропластного генома альбиносных растений-регенерантов ярового тритикале в целом согласуются с данными, полученными на дигиплоидных линиях пшеницы [19]. Однако у альбиносных растений мягкой пшеницы, изученные гены, как правило, детектировались с более высокой частотой. В частности ген *atpE* обнаруживался у всех хлорофиллдефектных растений [23].

Таблица 3

Частота изменений генома пластид альбиносных растений ярового тритикале

Гены	Число генотипов с изменениями генов	
	шт.	%
<i>rbcL</i>	7	36,8
<i>psaA</i>	10	47,4
<i>petA</i>	12	68,4
<i>atpB</i>	18	94,7
<i>atpE</i>	4	21,1
<i>cemA</i>	4	21,1
<i>trnE</i>	0	0

Ранее проведенные исследования хлоропластной ДНК альбиносных растений, полученных методом культуры пыльников, показали, что структурные изменения хлоропластного генома имеют характер делеций [11]. Это позволяет нам говорить о том, что, скорее всего, происходит делеция не детектируемых исследуемых генов или участков пластидной ДНК с данными генами.

В культуре пыльников и изолированных микроспор злаков известны две чувствительные стадии, на которых можно изменить соотношение зеленых и альбиносных растений [23]. Это стадия одноядерной микроспоры, на которой с помощью стрессовых воздействий можно произвести переключение с нормального гаметофитного пути развития микроспоры на спорофитный путь развития *in vitro*, и которая сопровождается процессами деградации и восстановления цитоплазматических органелл и их содержимого. И вторая стадия

– дифференцировка апикальных меристем в морфогенетические структуры в ходе регенерации растений в культуре пыльников. В связи с этим, на основании полученных нами данных по структурным изменениям пластидного генома тритикале, мы предполагаем, что изменения исследованных фотосинтетических генов, которые приводят к формированию альбиносного фенотипа в культуре пыльников *in vitro*, могут быть связаны с неполной остановкой деградации пластидного генома при переключении гаметофитного пути развития микроспор пыльника *in vivo* на спорофитный *in vitro*. Также деградация пластидных геномов в культуре пыльников может происходить в ходе регенерации растений и быть связанной с ошибками репликации, происходящими вследствие экстенсивной амплификации пластидной ДНК и пластид, как это было показано для растущих эмбриоидов в условиях *in vivo* [24]. Следует подчеркнуть, что выявленная нами

высокая частота изменений в хлоропластном геноме может являться следствием влияния

R-генома ржи на стабильность пластидного генома тритикале.

Заключение

Пластидная ДНК хлорофилл-дефектных растений-регенерантов тритикале характеризуется значительными перестройками по сравнению с зелеными регенерантами.

Показано, что изменения пластома затрагивают 6 из 7-ми изученных генов. При

этом, с наибольшей частотой не выявляется ген *atpB*, кодирующий β -единицу CF_1 комплекса АТФ-азы. Выявленные перестройки могут обуславливать возникновение альбиносных растений в культуре пыльников *in vitro*.

Список использованных источников

1. Кременевская, Е.М. Андрогенез *in vitro* у тритикале и секалотритикум: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.М. Кременевская. – Мн., 2005. – 129 л.
2. Eudes, F. An Overview of Triticale Doubled Haploids / F. Eudes, A. Chugh // *Advances in Haploid Production in Higher Plants* / A. Touraev [et al.]. – Springer Netherlands, 2008. – Ch. 6. – P. 87-96.
3. O'Neill G.P. Transfer RNA and the formation of the heme and chlorophyll precursor 5-aminolevulinic acid / G.P. O'Neill, D. Söll // *Bio Factors*. – 1990. – Vol. 2. – P. 227-235.
4. Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals / E. Ankele [et al.] // *Acta Phys. Plant.* – 2005. – Vol. 27, № 4. – P. 651-665.
5. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization / M. Dogramaci-Altuntee [et al.] // *The American Genetic Association*. – 2001. – Vol. 92. – P. 56-64.
6. Reciprocal substitution analysis of embryo induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) / M. Ghaemi [et al.] // *Genome*. – 1995. – Vol. 38, № 1. – P. 158-165.
7. Bregitzer, P. Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus / P. Bregitzer, R.D. Campbell // *Crop Sci.* – 2001. – Vol. 41, № 5. – P. 173-179.
8. Identification and validation of QTLs for green plant percentage in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture / M. Muñoz-Amatriaín [et al.] // *Mol. Breeding*. – 2008. – Vol. 22, № 1. – P. 119-129.
9. Torp, A. M. Albinism in Microspore Culture / A. M. Torp, S. B. Andersen // *Advances in Haploid Production in Higher Plants* / A. Touraev [et al.] // Springer Netherlands, 2008. – Ch. 12. – P. 155-160.
10. Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) / Y. Mano [et al.] // *Breed. Sci.* – 1996. – Vol. 46, – № 1. – P. 137-142.
11. Mouritzen P. Chloroplast genome breakdown in microspore cultures of Barley (*Hordeum vulgare* L.) occurs primarily during regeneration / P. Mouritzen, P.B. Holm // *Plant Physiol.* – 1994. – Vol. 144. – P. 586-593.
12. Variations in chloroplast from rice (*Oryza sativa*): Differences between deletions mediated by short direct repeat sequences within a single species / A. Kanno [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – Vol. 86. – P. 579-584.
13. Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure / G. De Santis-Maciossek [et al.] // *The Plant Journal*. – 1999. – Vol. 18, № 5. – P. 477-489.
14. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding / M. Wang [et al.] // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 124, № 5. – P. 523-530.
15. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / I.K.D. Tuvešson [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1989. – Vol. 78. – P. 879-883.
16. The involvement of the plastid genome in albino plant regeneration from microspores in wheat / B.J. Hofinger [et al.] // *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells: Proceedings of the COST 824 final meeting*. Bled, Slovenia, 1-5 July 2000 / ed. B. Bohanec – Brussels, – 2000. – P. 215-228.
17. Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production / M. Muñoz-Amatriaín [et al.] // *Funct. Integr. Genomics*. – 2009. – Vol. 9. – P. 311-323.

18. Зайцева, О.И. Характеристика процесса пыльцевого эмбриогенеза у перспективных сортов ярового тритикале и гибридов с их участием / О.И. Зайцева, П.А. Орлов // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2009. – №1. – С. 63-67.
19. Анализ изменчивости эволюционно нестабильных областей хлоропластного генома у растений, полученных в культуре пыльников дигамплоидных линий пшеницы / Г.В. Мозгова [и др.] // Генетика. – 2006. – Т. 42, – №2. – С. 192-197.
20. Дорохов Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD-анализа растительных геномов / Д.Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33, – №4. – С. 443-450.
21. Орлов П.А. Функциональная геномика морфогенеза – Мн.: Право и экономика, – 2005. – 518 с.
22. Ogihara V. Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis / V. Ogihara, K. Tsunewaki // Theor. Appl. Genet. – 1988. – Vol. 76. – P. 321-332.
23. Мозгова, Г.В. Генетические и биохимические механизмы альбинизма в культуре пыльников дигамплоидных линий пшеницы (*Triticum aestivum* L.): дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Г.В. Мозгова. – Мн., – 2008. – 154 л.
24. Quantitative fluorescence microscopy on dynamic changes of plastid nucleoids during wheat development / S. Miyamura [et al.] // Protoplasma. – 1986. – Vol. 113, – № 1. – P. 66-72.

Н.Н. Петрова, С.В. Егоров

УТОЧНЕНИЕ МЕТОДА ОРТОГОНАЛЬНОГО АНАЛИЗА В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия»,
Республика Беларусь, 213410, Могилевская обл., г. Горки, ул. Мичурина, 5

Введение

Одним из наиболее узких мест работы, где теряется не менее 95% наиболее ценных генотипов, является отбор по фенотипу отдельных растений в гибридном питомнике. В селекции сорта множество количественных признаков невозможно скоррелировать, отсюда следует представлять генотип как систему. На каждом фоне с учетом действия лимитирующих климатических факторов работает конкретный набор признаков, повышающих устойчивость [8-10]. Поэтому необходимо среди комплексных признаков выбрать ортогональные – фонový и селекционный, которые меняются под действием внешнего фактора. С выходом на эти признаки и их детальным анализом выявляются индивидуальные растения или отдельные биотипы, сорта с повышенной урожайностью. Селекционеры и сортоиспытатели больше привлекают новые методы, к числу которых относится ортогональный анализ, дающий возможность идентифицировать генотипы по фенотипу с признаками, наиболее соответствующими друг другу, но требующий большей ясности от статистических расчетов. Поэтому разработка уточнений по применению метода является актуальным направлением исследований.

С разработкой новых математических подходов, отвечающих поставленным селекционным задачам, селекционер получит возможность ускорить процесс выведения сорта на основе отбора нужных генотипов. Кроме того, уточненный метод ортогонального анализа будет обладать универсальной возможностью в использовании не только для решения селекционных задач, но и для проведения исследований по другим проблемам.

Цель исследований – дополнить метод ортогонального анализа до уровня алгоритма для выделения селекционно-ценных форм.

Для выполнения поставленной цели нами решались следующие задачи:

1) разработать способ расчета, позволяющий выделять генотипы по отклонению показателей (сдвига) от основных характеристик – зоны с определенным сочетанием селекционного и фонового признаков;

2) отработать алгоритм вычисления параметров ортогональной регрессии для нахождения генотипов с оптимальным сочетанием признаков, обеспечивающих прирост продуктивности (усиление обратной корреляции между массой зерна и массой соломы у пшеницы).

В.А. Драгавцевым, А.Б. Дьяковым [6] был создан и испытан принцип фонового признака (ФП) и открыто явление разнонаправленности – ортогональности в биологическом плане. Предложенная авторами модель эколого-генетической организации количественного признака определяла, что для признака, подверженного феномену взаимодействия «генотип-среда», невозможно дать стабильную «паспортную» генетическую характеристику для всех сред [12].

Фоновый признак (ФП): солома или мякина – это признак, который чувствителен к «N» причинам изменчивости, вызывающим сдвиги селекционного признака (СП) – колос, зерно, кроме одной причины, которая влияет на СП, но к которой ФП либо нечувствителен, либо смещает в противоположном СП направлении [7].

Системы координат СП – ФП позволяют экспрессно, без смены поколений, идентифицировать генотип индивидуального организма по фенотипу, т.е. быстро получить информацию о том, детерминировано ли данное фенотипическое значение признака у данной особи генетическими системами или оно представляет собой модификацию, т.е. возникло в результа-

те влияния микроэкологической ниши обитания данной особи. При этом вклады генотипа и среды оцениваются количественно в шкале измерений признака [6, 7, 5].

Новое научное мировоззрение на оценку проявлений в фенотипе особи генетических и средовых эффектов открыло перспективы резкого повышения эффективности селекции растений [7].

Материалы и методы

Все расчеты по методу ортогонального анализа осуществлялись на основе модели эколого-генетической организации количественного признака, предложенной В.А. Драгавцевым [6, 7], и с ними сопоставлялись наши уточнения. Расчеты были выполнены в приложении «Microsoft Excel» [13]. Для оценки сочетаний СП – ФП нами введена нормализация данных, позволяющая достичь быстрого эффекта при сравнении результатов. Сравнения велись по сдвигам – отклонениям определенных качеств от типичных характеристик.

Другое уточнение к методу ортогонально-

го анализа сводилось к расчетам среднего квадратического отклонения, служащего для оценки наиболее вероятной средней ошибки единичного наблюдения, взятого из совокупности. По результатам нормализации данных строились графики ортогональной регрессии с размещением значений признаков по зонам с определенным сочетанием СП – ФП. Уточнения по расчетам параметров ортогонального анализа позволили определить нужные сочетания показателей с оценкой повышения коэффициента корреляции между признаками.

Результаты и обсуждение

В поисках лучших генотипов на основе метода ортогональной регрессии авторы [6, 7] предлагают вести оценку с учетом линии регрессии, построенной за счет дисперсии от генеральной совокупности по двум анализируемым признакам.

При использовании данного подхода нами выявлено, что контур зоны рассеивания значений признаков, совокупности генотипов может в значительной степени изменяться в зависимости от знака в формуле ортогональной регрессии. Ввиду этого не получается четкая картина по зонам распределения величин признаков, что затрудняет идентификацию отдельных генотипов. По методике В.А. Драгавцева [6, 7, 5], сдвиги определяются как расстояние по перпендикуляру, опущенному от точки показателя на положительную линию регрессии (мера «работы» генов аттракции) и на отрицательную линию регрессии (мера «работы» генов адаптивности). Однако такой способ расчета величин сдвигов является, по нашему мнению, довольно трудоемким, усредненным и требует корректировки.

В связи с необходимостью уточнения указанных особенностей методики анализа генетико-физиологических систем [6] нами были применены подходы, наиболее точно отвечающие

требованиям анализа генотипа по фенотипу растения, особенно в случаях, требующих точного отбора единичных уникальных генотипов в общей генеральной совокупности.

Наши уточнения сводятся к расчету следующих показателей:

В качестве основного показателя, характеризующего генеральную совокупность по величине изучаемого признака, использована средняя арифметическая (\bar{X}):

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x}{n} \quad (1)$$

Для определения значений среднего квадратического отклонения (стандартного отклонения) использована следующая формула:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

где x – выборочное среднее (число 1, 2, ...),
 n – размер выборки.

Стандартное отклонение позволяет судить о наиболее вероятной средней ошибке отдельного, единичного наблюдения, взятого из данной совокупности. В пределах одного значения ($\pm 1\sigma$) и укладывается примерно 2/3 всех наблюдений, или точнее, 68,3% всех

вариант, т.е. основное ядро изучаемого ряда величин. Поэтому стандартное отклонение называют также основным отклонением вариационного ряда. Следовательно, возможны отклонения от (\bar{x} -среднего), превосходящие $\pm\sigma$, но вероятность их по мере удаления отклонений от $\pm\sigma$ все время уменьшается. Так, вероятность встретить вариант, отклоняющуюся от (\bar{x} -среднего) на величину больше $\pm 3\sigma$, составляет всего около 0,3%. Поэтому утроенное значение стандартного отклонения принято считать предельной ошибкой отдельного наблюдения, и, следовательно, почти все значения вариант в вариационном ряду укладываются в пределах $\pm 3\sigma$. Шестикратное значение среднего квадратического отклонения (от $\pm 3\sigma$ до -3σ) дает ясное представление о ширине ряда наблюдений, о его рассеянии [4].

3. Показателем, характеризующим отдельную варианту (или группу вариант), служит нормированное отклонение (Z). Оно является также показателем разнообразия признака и представляет выраженное в долях сигмы (σ) взвешенное отклонение соответствующей варианты от средней арифметической.

Для нормализации значений проведен расчет

путем вычитания среднего из значения данных и деления результатов на « σ » по формуле:

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma} \quad (3)$$

где X – нормализуемое значение по X – признаку;

μ – генеральная средняя;

σ – стандартное отклонение для конкретного генотипа.

Нормализация представляет собой преобразование исходных данных к такому виду, чтобы их среднее равнялось нулю, а σ – единице [1-3].

Примененная в методике процедура нормализации данных служит в качестве существенного дополнения к методу ортогонального анализа [11] с целью наиболее точного установления различий между генотипами (табл.1).

По результатам нормализованных данных получаются как отрицательные (-1σ), так и положительные ($+1\sigma$) значения по анализируемым признакам, что позволяет при использовании логической формулы группировать их по направленности отклонений («+» или «-»).

Таблица 1

Нормализованные показатели у гибридов F_2 по массе колоса и массе соломы

№ п.п.	Гибридные комбинации	Показатели по ФП (масса соломы)			Показатели по СП (масса колоса)		
		Масса соломы, г.	Нормализованные данные	Сдвиги	Масса колоса, г.	Нормализованные данные	Сдвиги
1	2	3	4	5	6	7	8
1	Sleiper x Ершовская 10	2,02	-0,63	-	3,27	1,29	+
2	Sleiper x КИТ	2,55	0,42	+	2,8	0,12	+
3	Sleiper x Спартанка	1,29	-2,07	-	1,92	-2,07	-
4	Sleiper x Кинельская 4	1,41	-1,83	-	2,26	-1,22	-
5	Sleiper x Гродненская 23	1,73	-1,20	-	2,21	-1,35	-
6	Sleiper x Гродненская 53	1,35	-1,95	-	2,25	-1,25	-
7	Sleiper x Надзея	1,76	-1,14	-	2,41	-0,85	-
8	Sleiper x Heines 2	1,84	-0,98	-	2,63	-0,30	-
9	Sleiper x Степь	1,34	-1,97	-	2,37	-0,95	-
10	Березина x Степь	2,88	1,07	+	3,67	2,28	+
11	Березина x Надзея	2,01	-0,65	-	2,75	0,00	-
12	Березина x Кинельская 4	2,55	0,42	+	3,3	1,36	+
13	Березина x Ершовская 10	1,86	-0,94	-	3,23	1,19	+
14	Пошук x Гармония	3,68	2,65	+	2,91	0,39	+

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
15	Пошук x Sleiper	1,7	-1,26	-	2,39	-0,90	-
16	Пошук x Степь	2,11	-0,45	-	2,43	-0,80	-
17	Пошук x Гродненская 23	3,17	1,64	+	3,26	1,27	+
18	Пошук x Березина	2,57	0,46	+	2,4	-0,87	-
19	Пошук x Надзея	2,31	-0,06	-	2,97	0,54	+
20	Надзея x Sleiper	3,19	1,68	+	3,13	0,94	+
21	Надзея x Ершовская 10	2,13	-0,41	-	2,74	-0,03	-
22	Надзея x Гармония	2,37	0,06	+	3,07	0,79	+
23	Надзея x Гродненская 23	2,23	-0,21	-	2,93	0,44	+
24	Надзея x Степь	2,2	-0,27	-	2,73	-0,05	-
25	Надзея x КИТ	2,62	0,56	+	3,4	1,61	+
26	Надзея x Пошук	2,8	0,91	+	2,9	0,37	+
27	Надзея x Heines 2	2,91	1,13	+	3,07	0,79	+
28	Степь x Надзея	1,71	-1,24	-	2,92	0,42	+
29	Степь x Спартанка	2,59	0,50	+	2,89	0,35	+
30	Степь x Гродненская 23	3,03	1,36	+	2,89	0,35	+
31	Степь x Пошук	2,62	0,56	+	3,22	1,17	+
32	Степь x Гармония	2,4	0,12	+	2,75	0,00	-
33	Степь x Кинельская 4	3,01	1,33	+	3,13	0,94	+
34	Степь x Гармония	2,72	0,75	+	2,69	-0,15	-
35	Степь x Sleiper	2,51	0,34	+	3,45	1,74	+
36	Степь x Heines 2	2,68	0,67	+	2,64	-0,28	-
37	Гармония x Кинельская 4	2,39	0,10	+	3,05	0,74	+
38	Гармония x Степь	2,33	-0,02	-	2,59	-0,40	-
39	Гармония x Березина	2,71	0,73	+	2,81	0,15	+
40	Гармония x Спартанка	1,98	-0,71	-	3,27	1,29	+
41	Гармония x Гродненская 23	2,2	-0,27	-	2,93	0,44	+
42	Гармония x Пошук	2,71	0,73	+	3,57	2,04	+
43	Гродненская 53 x Гармония	3,15	1,60	+	3,15	0,99	+
44	Гродненская 53 x Спартанка	3,19	1,68	+	2,52	-0,57	-
45	Гродненская 53 x Пошук	2,34	0,00	+	3,51	1,89	+
46	Гродненская 53 x Ершовская 10	1,69	-1,28	-	2,85	0,25	+
47	КИТ x Гродненская 53	1,82	-1,02	-	2,42	-0,82	-
48	КИТ x Степь	2,08	-0,51	-	2,51	-0,60	-
49	КИТ x Sleiper	2,37	0,06	+	2,77	0,05	+
50	КИТ x Спартанка	2,05	-0,57	-	2,66	-0,23	-
51	КИТ x Гармония	2,07	-0,53	-	2,65	-0,25	-
52	КИТ x Heines 2	2,01	-0,65	-	2,79	0,10	+
53	КИТ x Березина	1,97	-0,73	-	2,54	-0,52	-
54	КИТ x Гродненская 23	2,28	-0,12	-	2,76	0,02	+
55	Heines 2 x КИТ	2,52	0,36	+	2,82	0,17	+
56	Heines 2 x Кинельская 4	3,47	2,23	+	2,86	0,27	+
57	Heines 2 x Гармония	2,72	0,75	+	2,56	-0,48	-
58	Heines 2 x Гродненская 23	2,85	1,01	+	3,02	0,67	+
59	Heines 2 x Гродненская 53	2,89	1,09	+	2,38	-0,92	-
60	Спартанка x Heines 2	1,84	-0,98	-	2,41	-0,85	-
61	Спартанка x Надзея	2,11	-0,45	-	2,56	-0,48	-
62	Спартанка x Березина	2,28	-0,12	-	2,9	0,37	+
63	Спартанка x Пошук	2,18	-0,31	-	2,04	-1,77	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
64	Спартанка х Гродненская 53	2,22	-0,23	-	2,22	-1,32	-
65	Спартанка х Гродненская 23	2,7	0,71	+	2,55	-0,50	-
66	Спартанка х КИТ	1,88	-0,91	-	2,33	-1,05	-
67	Спартанка х Гармония	2,4	0,12	+	2,48	-0,67	-
68	Спартанка х Степь	2,44	0,20	+	2,02	-1,82	-
69	Кинельская 4 х Гродненская 23	1,72	-1,22	-	2,62	-0,33	-
70	Кинельская 4 х Гармония	2,17	-0,33	-	2,77	0,05	+
71	Кинельская 4 х Спартанка	2,62	0,56	+	3,19	1,09	+
72	Кинельская 4 х Гродненская 23	1,55	-1,56	-	2,63	-0,30	-
73	Кинельская 4 х КИТ	2,88	1,07	+	2,92	0,42	+
74	Кинельская 4 х Ершовская 10	2,18	-0,31	-	3,12	0,92	+
75	Кинельская 4 х Heines 2	1,6	-1,46	-	2,49	-0,65	-
76	Кинельская 4 х Sleiper	1,96	-0,75	-	3,06	0,77	+
77	Степь х Гродненская 53	3,05	1,40	+	2,63	-0,30	-
78	Степь х Березина	2,78	0,87	+	2,75	0,00	-
79	Степь х Ершовская 10	2,92	1,15	+	3,08	0,82	+
80	Гродненская 23 х Гродненская 53	2,1	-0,47	-	2,63	-0,30	-
81	Гродненская 23 х Пошук	2,08	-0,51	-	3,49	1,84	+
82	Гродненская 23 х Березина	2,64	0,60	+	2,65	-0,25	-
83	Гродненская 23 х Степь	2,87	1,05	+	2,63	-0,30	-
84	Ершовская 10 х Березина	1,98	-0,71	-	2,33	-1,05	-
85	Ершовская 10 х Гродненская 23	2,2	-0,27	-	2,54	-0,52	-
86	Ершовская 10 х Sleiper	1,83	-1,00	-	2,29	-1,15	-
87	Ершовская 10 х Спартанка	1,87	-0,92	-	2,55	-0,50	-
88	Ершовская 10 х Степь	2,29	-0,10	-	1,67	-2,69	-
89	Ершовская 10 х Кинельская 4	1,75	-1,16	-	2,14	-1,52	-
90	Ершовская 10 х Пошук	2,12	-0,43	-	1,58	-2,91	-
91	Ершовская 10 х Гармония	2,03	-0,61	-	2,63	-0,30	-
92	Ершовская 10 х Heines 2	1,79	-1,08	-	2,74	-0,03	-
93	Гродненская 53 х Спартанка	3,42	2,13	+	2,89	0,35	+
94	Гродненская 53 х Степь	3,08	1,46	+	2,74	-0,03	-
95	Гродненская 53 х КИТ	2,52	0,36	+	2,84	0,22	+
96	Гродненская 53 х Heines 2	2,34	0,00	+	3,44	1,71	+
97	Гродненская 53 х Гродненская 23	2,81	0,93	+	3,34	1,46	+

Число фиксируемых компонентов для каждого показателя является окончательно установленной величиной и определяет пространство (зоны с определенным сочетанием СП-ФП), обозначающее определенное качество. Поэтому следующим этапом расчетов служит разделение пространства на зоны с определенным сочетанием набора показателей (значений), отличающих смежные показатели качества. Это достигается путем нахождения отклонений определенных параметров качества от типичных характеристик пространства, в котором они находятся, что характеризуется сдвигами значений от оси разделяющей смежные пространства.

Для расчета отклонений (направленности сдвига от среднего значения признака по каждому генотипу) используют следующее выражение:

$$Y = \frac{(y_1 - \bar{Y})}{\sigma} \quad (4)$$

где x_1 , y_1 – индивидуальное (или среднее) значение признака x или y ;

\bar{X} , \bar{Y} – среднее всех особей в сорте (или среднее средних величин сортов при расчете генотипической регрессии).

В данном случае нормализация идет по каждому из анализируемых признаков, в результате чего получается значение направ-

ленности сдвига («+» или «-»).

Как следует из данных таблицы, наблюдается четкая связь между значениями нормализованных данных и сдвигами («+» и «-»), определенными с применением логической формулы в приложении «Microsoft Excel» [13].

Необходимо отметить, что ортогональная линия регрессии всегда перпендикулярна к генетической линии регрессии [1-3].

Для расчета параметров ортогональной регрессии используется следующее выражение:

$$R = \frac{x}{y} \text{ и } R = \frac{y}{x} \quad (6)$$

где, x – фактическое значение фонового признака;

y – фактическое значение селекционного признака.

Полученные значения ортогональной регрессии также нормализуются (табл. 1).

Для построения диаграммы используются нормализованные данные фактических показателей ФП и СП.

Разработанный алгоритм расчета позволяет анализировать совокупность генотипов отдельно, т.е. по отрицательной и положительной линиям регрессии или их сочетаниям по фоновому и селекционному признакам, или по их совокупности (рис. 1-5).

В целом, полученная в результате проведенных расчетов диаграмма иллюстрирует нормализованные данные отдельных генотипов с отчетливым разделением на зоны.

Точки данных на графике сосредоточены по положительной линии регрессии в форме вытянутого эллипса, что означает – амплитуда по генам адаптивности больше, чем

по генам аттракции (рис. 1, рис.3). Анализ диаграммы с отрицательной линией регрессии (рис. 2, рис.4) показывает, что величины ортогональны.

Известно, что ортогональное преобразование – линейные преобразования евклидова векторного пространства, сохраняющие неизменным длины или (что эквивалентно этому) скалярное произведение векторов. В ортогональном и нормированном базисе ортогональному пространству соответствует ортогональная матрица. Ортогональные преобразования образуют группу вращений данного евклидова пространства вокруг начала координат. В трехмерном пространстве ортогональное преобразование сводится к повороту на некоторый угол вокруг некоторой оси, проходящей через начало координат 0, если определитель соответствующей ортогональной матрицы равен +1. Если же этот определитель равен -1, то поворот дополняется зеркальным отражением относительно плоскости, проходящей через 0. В двумерном пространстве, т.е. в плоскости, ортогональное преобразование определяет поворот на некоторый угол вокруг начала координат 0 или зеркальное отражение относительно некоторой прямой, проходящей через 0. Ортогональное преобразование используется при приведении к главным осям квадратичной формы, в нашем случае – к линейной генетической регрессии [6].

Каждое пространство (зона) характеризуется определенным сочетанием и направленностью значений по оцениваемым селекционному и фоновому признакам, что позволяет судить о предполагаемой ценности анализируемых генотипов. В свою очередь, линия ортогональной регрессии позволяет оценивать анализируемые генотипы по скрытому потенциалу признаков (рис. 1).

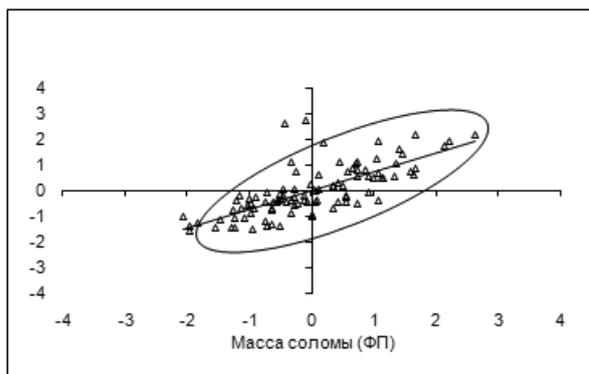


Рис. 1. График с положительной линией ортогональной регрессии по ФП (масса соломы).

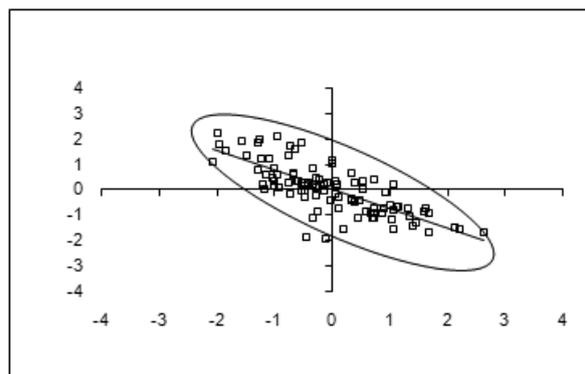


Рис. 2. График с отрицательной линией ортогональной регрессии по ФП (масса соломы).

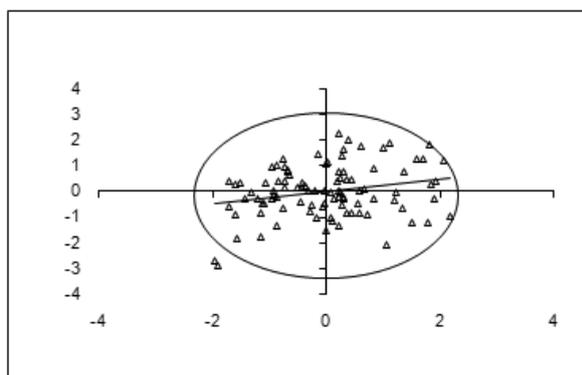


Рис. 3. График с положительной линией ортогональной регрессии по СП (масса колоса).

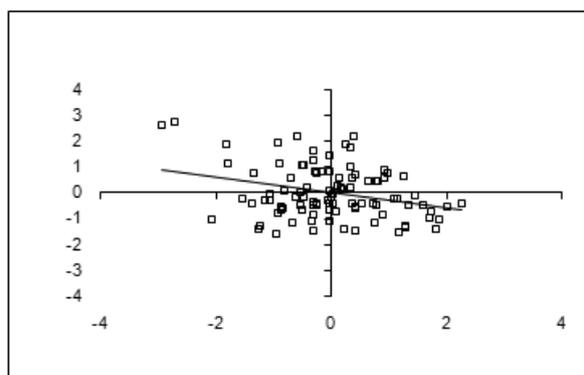


Рис. 4. График с отрицательной линией ортогональной регрессии по СП (масса колоса).

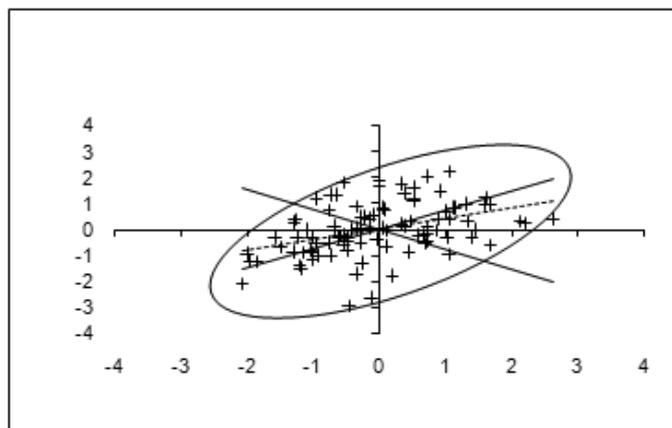


Рис. 5. Итоговый график ортогональной регрессии по СП и ФП.

Так, анализ полученных графиков ортогональной регрессии позволяет определить, что совокупность данных, перенесенных на график, образует четкую форму эллипса по росту (в случае с положительной регрессией) или уменьшению (в случае с отрицательной регрессией) значений признака (рис. 1-4). В данном случае имеется возмож-

ность оценить сочетание систем адаптивности и аттракции. Так, если линия регрессии по ФП отклонилась против часовой стрелки, это может означать, что гены «-attg» связаны с генами «+ad», что особенно заметно по селекционному признаку (рис. 5). После переноса данных на линии регрессии, рассчитанные по селекционному признаку, можно

установить, что линия регрессии рядов повернулась против часовой стрелки, что свидетельствует о том, что гены «+attr» связаны с генами «+ad». Основным выводом, извлекаемым из этих данных, позволяет выявить два или более одинаковых признака у растения. В этом случае линия регрессии будет связана по селекционному и фоновому признакам с меньшим разбросом точек данных от центра пересечения осей, т.е. от начала роста этих признаков при их взаимосвязи.

В результате проведенных сравнений по селекционному и фоновому признакам строится график с нормализованными данными, где анализируемые признаки размещены точно по своим зонам, так как каждое индивидуальное растение анализируется сразу по двум признакам, например, «масса соломы» и «масса колоса», на графике это одна точка, которая имеет два значения («+» и «-»).

Разработанный алгоритм расчета позволяет селективно отобрать желаемые сочетания по анализируемым признакам из всей генеральной совокупности с выделением интересующих нас форм (сортов, генотипов, биотипов и т.п.). В таблице 2 приведены формы с определенным сочетанием по фоновому и селекционному признакам с оптимальным выражением адаптивности.

Как следует из представленных в таблице результатов, в ходе проведенного отбора в категорию с высоким эффектом адаптивности вошли только те гибридные комбинации, которые проявили положительные сдвиги по селекционному и фоновому признакам.

В таблице 3 приведены результаты отбора гибридных комбинаций, характеризующихся оптимальным значением СП и высоким эффектом аттракции: перекачки пластических веществ из соломы в колос.

Таблица 2

Гибриды F₂ с оптимальным сочетанием СП-ФП и высоким эффектом адаптивности

№ п.п.	Гибридные комбинации	Показатели по ФП (масса соломы)			Показатели по СП (масса колоса)		
		Масса соломы, г.	Нормализованные данные	Сдвиги	Масса колоса, г.	Нормализованные данные	
1	Березина x Степь	2,88	1,07	+	3,67	2,28	+
2	Березина x Кинельская 4	2,55	0,42	+	3,3	1,36	+
3	Пошук x Гармония	3,68	2,65	+	2,91	0,39	+
4	Пошук x Гродненская 23	3,17	1,64	+	3,26	1,27	+
5	Надзея x Sleiper	3,19	1,68	+	3,13	0,94	+
6	Надзея x Гармония	2,37	0,06	+	3,07	0,79	+
7	Надзея x КИТ	2,62	0,56	+	3,4	1,61	+
8	Надзея x Пошук	2,8	0,91	+	2,9	0,37	+
9	Надзея x Heines 2	2,91	1,13	+	3,07	0,79	+
10	Степь x Спарганка	2,59	0,50	+	2,89	0,35	+
11	Степь x Гродненская 23	3,03	1,36	+	2,89	0,35	+
12	Степь x Пошук	2,62	0,56	+	3,22	1,17	+
13	Степь x Кинельская 4	3,01	1,33	+	3,13	0,94	+
14	Степь x Sleiper	2,51	0,34	+	3,45	1,74	+
15	Гармония x Кинельская 4	2,39	0,10	+	3,05	0,74	+
16	Гармония x Березина	2,71	0,73	+	2,81	0,15	+
17	Гармония x Пошук	2,71	0,73	+	3,57	2,04	+
18	Гродненская 53 x Гармония	3,15	1,60	+	3,15	0,99	+
19	Гродненская 53 x Пошук	2,34	0,00	+	3,51	1,89	+
20	КИТ x Sleiper	2,37	0,06	+	2,77	0,05	+
21	Heines 2 x КИТ	2,52	0,36	+	2,82	0,17	+
22	Heines 2 x Кинельская 4	3,47	2,23	+	2,86	0,27	+

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
23	Heines 2 x Гродненская 23	2,85	1,01	+	3,02	0,67	+
24	Кинельская 4 x Спартанка	2,62	0,56	+	3,19	1,09	+
25	Кинельская 4 x КИТ	2,88	1,07	+	2,92	0,42	+
26	Степь x Ершовская 10	2,92	1,15	+	3,08	0,82	+

Таблица 3

Гибриды F₂ с оптимальным сочетанием СП и высоким эффектом аттракции

№ п.п.	Гибридные комбинации	Показатели по ФП (масса соломы)			Показатели по СП (масса колоса)		
		Масса соломы, г.	Нормализованные данные	Сдвиги	Масса колоса, г.	Нормализованные данные	Сдвиги
1	Березина x Ершовская 10	1,86	-0,94	-	3,23	1,19	+
2	Пошук x Надзея	2,31	-0,06	-	2,97	0,54	+
3	Надзея x Гродненская 23	2,23	-0,21	-	2,93	0,44	+
4	Степь x Надзея	1,71	-1,24	-	2,92	0,42	+
5	Гармония x Спартанка	1,98	-0,71	-	3,27	1,29	+
6	Гармония x Гродненская 23	2,2	-0,27	-	2,93	0,44	+
7	Гродненская 53 x Ершовская 10	1,69	-1,28	-	2,85	0,25	+
8	КИТ x Heines 2	2,01	-0,65	-	2,79	0,10	+
9	КИТ x Гродненская 23	2,28	-0,12	-	2,76	0,02	+
10	Спартанка x Березина	2,28	-0,12	-	2,9	0,37	+
11	Кинельская 4 x Гармония	2,17	-0,33	-	2,77	0,05	+
12	Кинельская 4 x Ершовская 10	2,18	-0,31	-	3,12	0,92	+
13	Кинельская 4 x Sleiper	1,96	-0,75	-	3,06	0,77	+
14	Гродненская 23 x Пошук	2,08	-0,51	-	3,49	1,84	+

Отмечено, что в данную категорию значений СП попали только те комбинации, которые имеют четко выраженный сдвиг

по системе аттракции, т.е. рост массы колоса и массы соломы имеет обратную зависимость.

Заключение

Разработанный алгоритм расчета позволяет находить генотипы с селекционным и фоновым признаками, наиболее соответствующими друг другу.

Поиск интересующих селекционера индивидуальных генотипов с использованием предложенного уточнения к методике В.А. Драгавцева [6, 7] позволяет выявить ценные формы, обеспечивающие прирост урожая за счет оптимального значения признаков. Ис-

пользование метода ортогонального анализа служит для надежного выделения лучших генотипов, что способствует оптимизации селекционного процесса.

Методика позволяет моделировать желаемые сочетания СП и ФП с увеличенным коэффициентом корреляции между ними и производить дифференциацию генотипов по направлению сдвигов каждого индивидуального растения.

Список использованных источников

1. Беклемешев, Д.В. Курс аналитической геометрии и линейной алгебры/ Д.В. Беклемешев. – М.: Наука. – 1976. – 320 с.
2. Бронштейн, И.Н. Справочник по математике / И.Н. Бронштейн, К.А. Семендяев. М.: Наука. – 1986. – 531 с.
3. Бугров, Я.С. Высшая математика: Элементы линейной алгебры и аналитической геометрии/ Я.С. Бугров, С.М. Никольский. – М.: Наука. – 1984. – 382 с.
4. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – Москва.: Агропромиздат. – 1985. – 351 с.
5. Драгавцев, В.А. К проблеме генетического анализа полигенных количественных признаков растений/ В.А. Драгавцев. – С-Пб.: ВИР, – 2003. – 35 с.
6. Драгавцев, В.А. Теория селекционной идентификации генотипов растений по фенотипам на ранних этапах селекции/ В.А. Драгавцев, А.Б. Дьяков // Фенетика популяций. – М.: Наука, – 1982. – С. 30-37.
7. Драгавцев, В.А. Эколого-генетический скрининг генофонда и методы конструирования сортов сельскохозяйственных растений по урожайности, устойчивости и качеству. (Новые подходы) / В.А. Драгавцев. – С-Пб.: ВИР, – 1998. – 52 с.
8. Петрова, Н.Н., Переопределение спектра генов озимой пшеницы у сортов-доноров в условиях Беларуси/ Н.Н. Петрова, Г.И. Левшунов // Материалы конф. Ч. 2. – агрономия, разд. 1. – Смоленск, Смоленский СХИ. – 1999. – С. 50-51.
9. Петрова, Н.Н. Взаимосвязь полигенных систем в адаптивной селекции озимой пшеницы/ Н.Н. Петрова, М.П. Акулич // Актуальные проблемы агрономии и пути их решения: материалы международной научно-практической конференции. – Горки: БГСХА, 2005. Вып. 1. ч. 2, – С.6-69.
10. Петрова, Н.Н. Селекция озимой пшеницы на адаптивность: рекомендации для селекционеров и семеноводов / сост.: Н.Н. Петрова. – БГСХА. Горки. – 2005. – 64 с.
11. Петрова, Н.Н. Идентификация генотипа по фенотипу методом ортогонального анализа / Н.Н. Петрова, Е.Б. Чапко // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2008 – №2, – С. 19-25.
12. Толковый словарь терминов по общей и молекулярной биологии; общей и прикладной генетике; селекции; ДНК-технологии и биоинформатике. Т.2. П-Я. – Москва, ИКЦ «Академкнига», «Медкнига». – 2008. – С. 308.
13. Уокенбах, Джон Диаграммы в Excel.: Пер. с англ. – М.: Издательский дом «Вильямс». – 2003. – 448 с.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФИТОТОКСИЧНЫХ ПСЕВДОМОНАД НА РАЗВИТИЕ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Возможность применения биологических и, в частности, микробиологических объектов для стимуляции роста культурных растений, а также защиты от фитопатогенов и сорных растений исследуется около 70 лет [1]. В начале 1980-х интерес к биологическому контролю (биологическая защита растений с помощью других организмов) резко возрос в связи с появляющимися возможностями получения биопрепаратов и биотехнологий, конкурентных химическим средствам защиты растений [2]. В почвах, как и в других природных субстратах, находятся организмы – ингибиторы, которые в процессе своей жизнедеятельности подавляют рост и развитие высших и низших растений. Они образуют особые вещества, токсичные для растительных тканей. Исследования показывают, что микробы-ингибиторы своими токсинами могут оказывать отравляющее действие на растения в условиях их естественного произрастания в почве [3]. Они подавляют прорастание семян, рост проростков, развитие растений в целом, в значительной степени увеличивают поражение растений фитопатогенами различной этиологии и понижают их общий урожай. При массовом развитии эти организмы могут оказываться существенным фактором в определении плодородия почвы и урожайности сельскохозяйственных растений. Количество микроорганизмов, населяющих почву ризосферы растений, которые оказывают неблагоприятный эффект на растения, оценивается в 8-26% [4]. В ризосфере растений, в отличие от свободной почвы, доминируют грамотрицательные бактерии, причем преобладают флюоресцирующие бактерии рода псевдомонас [5]. Псевдомонады могут быть нейтральными во взаимодействии с растениями, многие оказывают отрицательное или положительное влияние на рост и развитие

различных сельскохозяйственных культур. Разнообразие биосинтетических и катаболических реакций, особенности генетической организации, в частности наличие плазмид, широкие возможности для генно-инженерного манипулирования позволяют рассматривать псевдомонады в качестве наиболее перспективных объектов агробиотехнологии. В настоящее время в биоконтроле широко используются бактерии, обладающие совокупностью полезных для растений свойств, которые принято обозначать как PGPR (от Plant Growth Promoting Rhizobacteria – ризобактерии, способствующие росту растений) [2]. Кроме того, в последнее время ведутся активные поиски биологических средств борьбы с сорными растениями, альтернативных традиционным химическим. Предполагается разработка таких препаратов на основе фитотоксичных бактерий, оказывающих негативное влияние на рост растений, так называемых DRB (от Deleterious Rhizobacteria – вредные ризобактерии) [4]. Необходимо отметить, что классификация ризобактерий на DRB и PGPR несколько условна и основана на их результирующем влиянии на рост растений в определенных условиях среды. Кроме того, ризобактерии можно определить и как DRB, и как PGPR, если выделяемые ими метаболиты действуют угнетающе одновременно и на рост растения, и на фитопатогены [3]. Целью настоящей работы являлось изучение способности ризосферных псевдомонад, изолированных из почв производственных полей, продуцировать фитотоксины, исследования по характеристике реакции линий, сортов и гибридов сахарной свеклы белорусской и зарубежной селекции, возделываемых на производственных площадях Республики Беларусь, на фитотоксины наиболее активных штаммов.

Материалы и методы

В работе были использованы сорта и гибриды сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции, а также изолированные ранее и в процессе выполнения исследований штаммы псевдомонад.

Источниками выделения штаммов служили:

- корнеплоды сахарной свеклы (теплица БОС ИГиЦ НАНБ, поле БОС ИГиЦ НАНБ, поле №1 и поле №2 – производственные посевы Опытной-научной станции НАНБ по сахарной свекле, г. Несвиж (предшественник – яровой ячмень));

- почва с производственных посевов сахарной свеклы ОНС НАНБ по сахарной свекле (поле №4);

- почва с производственных посевов озимой пшеницы ОНС НАНБ по сахарной свекле (поле №3);

- почва с участка поля ОНС НАНБ по сахарной свекле, неблагоприятного для возделыва-

ния с/х растений (поле №5).

Из всех указанных источников было выделено всего 59 штаммов флюоресцирующих псевдомонад, в том числе 3 штамма – из теплицы БОС, 7 штаммов – с поля БОС, 11 штаммов – с поля №1; 26 – штаммов с поля №2; 6 штаммов – с поля №3; 4 штамма – с поля №4; 2 штамма – с поля №5.

Для выделения и селекции флюоресцирующих псевдомонад использовали среду Голда [6]. Первичная характеристика флюоресцирующих псевдомонад на способность продуцировать антиметаболиты проводили по описанной методике [7] с использованием в качестве индикаторной культуры *E. coli* В [8].

Фитотоксичное действие псевдомонад на растения сахарной свеклы оценивали по влиянию бактериальных изолятов на всхожесть семян и развитие проростков [9, 10].

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены результаты оценки отзывчивости сорта сахарной свеклы Белорусская 69 на инокуляцию семенного материала клетками штаммов флюоресцирующих псевдомонад, изолированных из различных почв. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о существенном уровне полиморфизма изолированных штаммов по признаку фитотоксичности. Как видно из данных, представленных в таблице 2, наибольшее количество штаммов, угнетающих развитие проростков сахарной свеклы, изолируется из производственных почв. Поскольку исследованные нами

штаммы выделялись, как правило, в осенний период и после уборки сельскохозяйственных культур, полученные нами данные согласуются с результатами исследований фитотоксичности различных сельскохозяйственных почв [11], в результате чего сделан вывод о том, что бактериальная фитотоксичность в большей степени характерна для почв, обедненных доступными формами углерода и с нерациональными севооборотами [12]. Результаты анализа полученных данных, представленные в таблице 3, подтверждают высокий уровень гетерогенности исследованных штаммов по характеру (см. стр. 28).

Таблица 1

Оценка влияния ризосферных псевдомонад на развитие проростков сахарной свеклы сорта Белорусская 69

Источник выделения	Штамм	Всхожесть % от контроля	Вес растения % от контроля	Длина корня % от контроля
Теплица БОС ИГиЦ	SB-1	90,6	90,7	88,0*
	SB-2	93,6	100,0	87,9*
	SB-3	95,3	94,0	94,9
Опытное поле БОС ИГиЦ	SB-5	82,8*	99,8	89,3
	SB-6	104,1	96,4	86,5*
	SB-7	76,5*	90,2	87,8*
	SB-8	85,9	92,9	85,6*
	SB-13	95,3	92,9	91,1
	SB-14	84,0*	103,4	79,4*
	SB-25	65,6*	72,1*	88,0*
Поле №1, ОНС НАНБ по сахарной свекле, г. Несвиж	SB-9	88,0	97,5	89,2*
	SB-15	94,0	100,0	95,3
	SB-16	86,6	98,2	114,4*
	SB-17	87,3	94,9	102,5
	SB-18	92,5	102,3	88,9*
	SB-19	82,0*	101,8	82,9*
	SB-20	101,5	101,1	88,9*
	SB-21	91,1	106,8	100,3
	SB-22	101,5	101,3	102,7
	SB-23	84,2*	93,4	90,5
	SB-24	94,0	102,9	96,1
Поле №2, ОНС НАНБ	SB-10	74,6*	93,8	104,5
	SB-26	87,3	87,5*	82,3*
	SB-27	87,3	88,4*	102,7
	SB-28	69,9*	74,9*	82,3*
	SB-29	76,2*	100,0	89,3*
	SB-30	92,0	95,9	109,2
	SB-31	79,4*	97,7	103,0
	SB-32	100,0	87,8*	123,2*
	SB-33	82,5*	102,6	98,8
	SB-34	95,6	95,3	108,7
	SB-35	97,0	103,5	96,8
	SB-36	90,5	97,1	94,5
	SB-37	101,4	104,3	105,3
	SB-38	91,1	93,9	97,2
	SB-39	89,7	85,2*	96,3
	SB-40	83,8*	95,1	95,9
	SB-11	100,0	96,5	87,5*
	SB-12	88,2	102,1	87,4*
	SB-41	110,3	100,0	98,4
	SB-42	117,0**	95,2	91,1
SB-43	98,3	97,3	97,1	
SB-44	103,4	88,6	95,0	

Продолжение таблицы 1

	SB-45	111,9	97,9	99,2
	SB-46	69,8*	77,1*	67,1*
	SB-47	89,8	93,7	103,7
	SB-48	101,6	97,4	86,4*
Поле №3 ОНС НАНБ	SB-50	61,4*	89,0*	91,0
	SB-51	72,9*	90,1*	90,3
	SB-52	72,9*	97,8	88,8*
	SB-53	88,6	89,7*	92,2
	SB-54	81,4*	94,7	101,7
	SB-55	84,3	75,6*	91,5
Поле №4 ОНС НАНБ	SB-56	82,8*	80,9*	86,6*
	SB-57	77,2*	93,8	86,2*
	SB-58	91,4	98,7	103,9
	SB-59	87,1	97,4	97,6
Поле №5 ОНС НАНБ	SB-60	95,2	92,5	70,7*
	SB-61	84,2*	100,2	93,6

* отличие от контроля достоверно при $P_{0,05}$

Таблица 2

Структура популяции флюоресцирующих псевдомонад в ризосфере сахарной свеклы

Источник выделения штаммов	Влияние штаммов на всхожесть растений			Влияние штаммов на вес растений			Влияние штаммов на длину корня растений		
	Нейтральное, %	Отрицательное, %	Положительное, %	Нейтральное, %	Отрицательное, %	Положительное %	Нейтральное, %	Отрицательное, %	Положительное, %
Теплица БОС	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0
Поле БОС	42,9	57,1	0,0	85,7	14,3	0,0	28,6	71,4	0,0
Поле №1 ОНС	81,2	18,2	0,0	100,0	0,0	0,0	54,5	36,4	9,1
Поле №2 ОНС	69,2	26,9	3,8	76,9	23,1	0,0	65,4	26,9	7,7
Поле №3 ОНС	33,3	66,7	0,0	33,3	66,7	0,0	50,0	50,0	0,0
Поле №4 ОНС	50,0	50,0	0,0	75,0	25,0	0,0	50,0	50,0	0,0
Поле №5 ОНС	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0

Таблица 3

Характеристика 38 штаммов ризосферных псевдомонад, угнетающих развитие проростков сахарной свеклы

Ростовые показатели	Количество штаммов, действующих на ростовые показатели	
	абс.	%
Всхожесть	7	18,4
Вес проростка	4	10,5
Длина корня	10	26,3
Вес проростка + длина корня	2	5,3
Всхожесть + длина корня	8	21,1
Всхожесть + вес проростка	1	2,6
Всхожесть + вес проростка + длина корня	6	15,8

проявляемой фитотоксичности. Значительное количество штаммов наряду с угнетением прорастания, снижением веса проростков и длины корневой системы оказывают негативный эффект на все исследованные показатели физиологического состояния культуры сахарной свеклы сорта Белорусский 69.

Для изучения специфичности негативно-го эффекта фитотоксичных псевдомонад при воздействии на различный генетический материал сахарной свеклы были проведены исследования отзывчивости четырех сортов отечественной селекции на инокуляцию двумя из наиболее активных штаммов. Как видно из результатов, представленных в таблице 4,

существенное снижение всхожести семян Белорусская 69 и Несвижского гибрида коррелировало со снижением как веса проростков, так и длины корневой системы. При этом необходимо отметить и существенную активацию семенной популяции фитопатогенов. Таким образом, при взаимодействии растений сахарной свеклы с фитотоксичными почвенными псевдомонадами уровень и характер негативно-го эффекта зависит как от генотипа растений, так и от свойств отдельных бактериальных штаммов, что подтверждает сделанные ранее выводы [13,14]. Приведенные выше данные и сделанные выводы подтверждаются и данными, представленными в таблице 5.

Таблица 4

Влияние штамма *Pseudomonas sp.*SB-46 на развитие проростков сахарной свеклы сортов отечественной селекции

Сорта сахарной свеклы	Всхожесть, % от контроля	Вес проростка, % от контроля	Длина корня, % от контроля	Увеличение заболеваемости проростков, %
Белорусская-69	63,8*	77,5*	65,4*	51,2
Несвижский гибрид	60,0*	65,0*	58,2*	51,3
Ганусовская-55	93,1	72,6*	66,2*	54,9
А-9541	100,0	89,3*	89,6*	26,6

*отличие от контроля достоверно при $P_{0,05}$

Таблица 5

Влияние штамма *Pseudomonas sp.* SB-28 на развитие проростков сахарной свеклы сортов отечественной селекции

Сорта сахарной свеклы	Всхожесть, % от контроля	Вес проростка, % от контроля	Длина корня, % от контроля	Увеличение заболеваемости проростков, %
Белорусская-69	94,0	101,4	98,9	0,5
Несвижский гибрид	71,1*	74,0*	73,9*	46,4
Ганусовская-55	91,9	73,4*	101,7	24,7
А-9541	93,4	98,6	96,6	15,1

*отличие от контроля достоверно при $P_{0,05}$

Сравнение результатов исследования штаммов SB-46 и SB-28, изолированных из различных почв, позволяет сделать вывод о том, что характер их негативного влияния на растения сахарной свеклы в значительной степени зависит от генетических особенностей изучаемых сортов и гибридов, и генетический материал поздней селекции менее отзывчив к воздействию бактериальных фитотоксинов.

Основные производственные площади посевов сахарной свеклы в Республике занимают гибриды зарубежной селекции. В связи с этим нами был проведен анализ отзывчивости генетического материала, в наибольшем объеме представленном в посевах в сезон 2007 – 2008 годов в свекловодческих хозяйствах. Семена сахарной свеклы дражированы компаниями-изготовителями защитным фунгицидно-инсектицидным составом, не обладающим в тоже время бактерицидной активностью. Сравнение результатов, представленных в таблицах 6 и 7, позволяет сделать вывод о том, что оба исследованных бактериальных штамма, SB-28 и SB-46, в той или иной мере негативно влияют на посевной материал и развитие проростков исследованных гибридов. Наибольшей устойчивостью к штамму SB-28 отличались гибриды Борута и Кристалл, у последнего наблюдалось некоторое снижение показателя всхожести. Штамм SB-28 практически не влиял на проявление семенной инфекции, что при сравнении с данными, представленными в таблице 7, возможно объяснить определенным супрессивным потенциалом этого штамма по отношению к фитопатогенам. Как видно из результатов,

представленных в таблице 7, штамм SB-46 негативно влиял на физиологическое состояние практически всех исследованных гибридов. Существенное увеличение заболеваемости проростков объясняется, очевидно, как угнетающим эффектом фитотоксинов, так и незначительным антагонистическим потенциалом штамма SB-46. Очевидно, можно сделать вывод о том, что негативное влияние фитотоксичных псевдомонад приведет к заметному снижению продуктивности отдельных гибридов в производственных посевах. Таким образом, целесообразно в дальнейшем проведение подобных исследований с другими гибридами и сортами сахарной свеклы, представленными на семенном рынке Республики Беларусь.

Определенная степень зависимости отзывчивости на бактериальные фитотоксины от генотипа сахарной свеклы очевидна из результатов исследований, представленных в таблицах 8 и 9. При оценке воздействия штамма SB-46 на гибрид отечественной селекции А-9896 и его родительские линии показано, что родительская линия ММ чувствительна к влиянию фитотоксинов, что привело к значительному снижению веса растений (на 22%) и длины корня (на 18%). Второй родительский компонент МС был невосприимчив к действию данного штамма. Вместе с тем, инокуляция штаммом SB-28 приводила к угнетению корневой системы проростков данного генотипа. Для гибрида А-9896 показано достоверное снижение веса растений (на 27%), длина корня статистически не отличалась от контроля. При этом, как и в случае гибридов зарубежной селекции, существенно увеличивалась заболеваемость проростков всех

трех генотипов. Полученные данные подтверждают роль как специфичности фитотоксичных бактерий во взаимодействии с растениями, так и генотипа растительного материала в уровне устойчивости/толерантности к бактериальным фитотоксинам.

Таблица 6

Влияние штамма *Pseudomonas sp.*SB-28 на развитие проростков сахарной свеклы сортов зарубежной селекции

Сорта сахарной свеклы	Всхожесть, % от контроля	Вес проростка, % от контроля	Длина корня, % от контроля	Увеличение заболеваемости проростков, %
Борута	89,8	97,9	111,9	1,9
Казино	95,3	78,8*	74,2*	36,3
Кристалл	78,8*	94,1	102,8	8,0
Марс	101,7	94,1	75,3*	13,0
Твинго	93,4	98,6	85,8*	6,1
Кассандра	88,0	88,4	74,2*	4,1

*отличие от контроля достоверно при $P_{0,05}$

Таблица 7

Влияние штамма *Pseudomonas sp.*SB-46 на развитие проростков сахарной свеклы сортов зарубежной селекции

Сорта сахарной свеклы	Всхожесть, % от контроля	Вес проростка, % от контроля	Длина корня, % от контроля	Увеличение заболеваемости проростков, %
Борута	89,4	78,7*	72,6*	35,2
Казино	71,6*	63,9*	65,7*	33,7
Кристалл	89,4	84,5*	83,2*	47,2
Марс	96,4	95,1	88,4*	27,0
Твинго	75,0*	91,4	81,2*	26,5
Кассандра	94,4	88,2	93,4	36,6

*отличие от контроля достоверно при $P_{0,05}$

Таблица 8

Влияние штамма *Pseudomonas sp.*SB-28 на развитие проростков гибрида сахарной свеклы А9896 и его исходных родительских форм

Сорта сахарной свеклы	Всхожесть, % от контроля	Вес проростка, % от контроля	Длина корня, % от контроля	Увеличение заболеваемости проростков, %
ММ-компонент	66,1	85,0*	87,3	15,6
МС-компонент	92,3	100,1	87,5*	0,6
Гибрид А9896	100,0	86,2*	88,5*	15,2

*отличие от контроля достоверно при $P_{0,05}$

Таблица 9

Влияние штамма *Pseudomonas sp.* SB-46 на развитие проростков гибрида сахарной свеклы А9896 и его исходных родительских форм

Сорта сахарной свеклы	Всхожесть, % от контроля	Вес проростка, % от контроля	Длина корня, % от контроля	Увеличение заболеваемости проростков, %
ММ-компонент	94,5	71,3*	75,0*	39,2
МС-компонент	101,8	93,7	100,1	36,8
Гибрид А9896	109,2	83,7*	90,8	23,8

*отличие от контроля достоверно при $P_{0,05}$

Заключение

В структуре популяции псевдомонад с производственных посевов от 27 до 38% выделенных штаммов оказывают отрицательное влияние на всхожесть растений сахарной свеклы сорта Белорусская-69, 23% снижают вес проростков, от 26 до 36% уменьшают длину корней. Обнаружены штаммы, стимулирующие рост проростков (от 4 до 9%). Остальные штаммы флюоресцирующих псевдомонад не оказывали воздействия на развитие растений сахарной свеклы.

Изучалось влияние активных штаммов токсинообразующих псевдомонад на развитие проростков сахарной свеклы отечественной и зарубежной селекции в гнотобиотической системе. Из выделенных штаммов ризосферных псевдомонад отобраны два с наиболее выраженным токсичным эффектом: *Pseudomonas sp.* SB-46 и SB-28. Показано, что штамм SB-46 угнетает развитие растений сортов сахарной свеклы Белорусская-69, Ганусовская-55, Несвижский гибрид, А-9541, что проявляется в снижении всхожести (от 60 до 93% от контроля), уменьшении длины корня (от 64 до 89%) и веса 7-дневных проростков у всех указанных сортов.

При исследовании отзывчивости 6 сортов зарубежной селекции (Борута, Кристалл, Казино, Марс, Твинго, Кассандра) к фитотоксинам штамма SB-46 установлено, что наиболее устойчивым является сорт Кассандра. Для сортов Твинго и Марс отмечено снижение длины корня (на 19 и 12% соответственно). У сортов Борута, Казино, Кристалл обнаружено влияние штамма как на длину корня (от 65 до 83% от контроля), так и на вес растения (от 63 до 84% от контроля). Для гибрида А-9896 показано достоверное снижение веса растений (на 27%), длина корня статистически не отличалась от контроля. Родительская линия ММ оказалась чувствительна к влиянию фитотоксинов, что привело к значительному снижению веса растений (на 22%) и длины корня (на 18%). Второй родительский компонент МС был невосприимчив к штамму SB-46.

Использование активных штаммов фитотоксичных псевдомонад позволяет оценить признак устойчивости генетического материала на ранних этапах селекционного процесса. Полученные результаты могут быть использованы в оптимизации агротехники возделывания сахарной свеклы.

Список использованных источников

1. Красильников, Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н.А. Красильников. – М.: Издательство АН СССР, 1958. – С. 338-352.
2. Schroth, M.N. Disease – Suppressive Soil and Root-Colonizing Bacteria / M.N. Schroth, J.G. Hancock // Science. – 1982. – Vol. 216. – P. 1376-1381.
3. Cherrington, C.A. Incidence of inhibitory pseudomonads in the Pacific Northwest / C.A. Cherrington, L.F.Elliott // Plant Soil. – 1987. – Vol. 101. – P. 159-165.
4. Nehl, D.B. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective / D.B. Nehl,

S.J. Allen, J.F. Brown // *Appl. Soil Ecol.* – 1996. – Vol. 5. – P. 1-20.

5. Смирнов, В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова. – Киев: Навукова думка. – 1990. – 438 с.

6. Gould, W.D. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats / W.D. Gould, C. Hagedorn, T.R. Bardinelli, R.M. Zablotowicz // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1985. – Vol. 49. – P. 28-32.

7. Gasson, M.J. Indicator technique for antimetabolite toxin production by phytopathogenic species of *Pseudomonas* / M.J. Gasson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1980. – Vol. 29. – P. 433-440.

8. Sambrook, J. *Molecular cloning: A laboratory Manual* 2nd ed. / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // N.Y. Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1989. – 489 p.

9. Elliott, L.F. Plant growth-inhibitory pseudomonads colonizing of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) roots / L.F. Elliott, J.M. Lynch // *Plant Soil.* – 1985. – Vol. 84. – P. 57-65.

10. Vaan de Geijn, Siebe C. A fast screening method for bacterial isolates producing substances affecting root-growth / Siebe C. Vaan de Geijn, Jose M.M. Van Maaren. // *Symbiosis.* – 1986. – Vol. 2. – P. 67-75.

11. Schippers, B. Integration of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the affect of cropping practices / B. Schippers, A.W. Bakker, A.H.M.B. Peter // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 1987. – Vol. 25. – P. 331-358.

12. Suslow, T.V. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth / T.V. Suslow, M.N. Schroth // *Phytopathology.* – 1982. – Vol. 72. – P. 111-115.

13. Howie, W.J. Rhizobacteria: influence of cultural and soil type on plant growth and yield of potato / W.J. Howie, E. Echandi // *Soil Biology and Biochemistry.* – 1983. – Vol. 15. – P. 127-132.

14. Kennedy, A.C. Suppressive to the weed-downy brome / A.C. Kennedy, L.F. Elliott, F.L. Young, C.L. Douglas // *Soil Science Society of American Journal.* – 1991. – Vol. 55. – P. 722-727.

Л.В. Милько, А.М. Свирщевская, А.В. Кильчевский

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМА ДНК ГИНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ И СОРТА БЕЛОРУССКАЯ ОДНОСЕМЯННАЯ 69 САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*) С ПОМОЩЬЮ RAPD-МАРКЕРОВ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Современное развитие сельскохозяйственных технологий предполагает разработку и внедрение новых подходов для изучения генетического разнообразия исходного материала сельскохозяйственных культур, что во многом зависит от прогресса в исследовании молекулярно-генетического полиморфизма генотипов. Одним из эффективных приемов изучения генетической изменчивости является анализ продуктов амплификации фрагментов ДНК, генерируемых в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР). Широкое распространение для дифференциации и распределения сортов по уровню генетической близости получили методы RAPD, SSRP, AFLP [1]. Для этих типов маркеров характерна более высокая по сравнению с биохимическими и морфологическими маркерами разрешающая способность, позволяющая дифференцировать генотипы линейного, гибридного и сортового материала, используя данные по многим локусам.

RAPD-анализ – это быстрый метод выявления генетического полиморфизма, который применяется для геномного маркирования в эволюционных исследованиях, для картирования хромосом и маркирования хозяйственно-ценных признаков, идентификации и дифференциации селекционно-значимого генетического материала различных сельскохозяйственных растений. С помощью RAPD маркеров были проанализированы виды и сорта картофеля [2], различные генотипы томатов [3], ячменя [4], пшеницы [5], инбредные линии подсолнечника [6] и многих иных культур. У свеклы RAPD маркеры были применены для таксономической характеристики ее однолетних диких видов – близких родичей

культивируемых свекл, содержащих важные для селекции признаки, что привело к успешному разделению образцов на 3 таксономических группы *macrocarpa*, *adanensis* и *maritima* [7]; при картировании генов устойчивости к нематоду и окраски гипокотыля, что привело к установлению 4 первичных групп сцепления, включающих 9 RAPD локусов, 2 изоферментных локуса и 2 указанных гена [8], при картировании генов устойчивости к ризомании *Rr1*, окраски гипокотыля *R* и односемянности плодов *M* с установлением 50 RAPD и 248 ПДРФ локусов [9]. Была также предпринята попытка идентифицировать сорта сахарной свеклы с помощью RAPD фингерпринтинга [10].

Сахарная свекла – облигатный перекрестник, и несмотря на то, что большинство ее современных сортов являются F1 гибридами, полученными с использованием ЦМС, они не являются генетически выровненными. Значительная генетическая вариабельность, наблюдаемая у нее, детектируется как с помощью изоферментов, так и с помощью ПДРФ маркеров [11], что позволило использовать эти данные для целей идентификации удвоенных гаплоидных линий свеклы [12]. Также была продемонстрирована межсортовая и внутрисортовая изменчивость, выявленная с использованием ПДРФ маркеров при попытке идентификации сортов свеклы [13]. Принимая во внимание результаты, полученные японскими и британскими исследователями, мы взяли в работу выровненный линейный материал сахарной свеклы. Эти гиногенетические линии были созданы нами в лаборатории экологической генетики и биотехнологии Института генетики и цитологии НАНБ путем эксперимен-

тального гиногенеза *in vitro*, и формировались при постоянном изучении различными методами (цитологии, цитофотометрии, изоферментного анализа, ДНК маркирования) [14].

Цель настоящей работы заключалась в оценке уровня полиморфизма ДНК у близкород-

ственных гиногенетических линий сахарной свеклы, полученных в культуре неоплодотворенных семян *in vitro* растений сорта Белорусская односемянная 69 (2х) и у самого сорта, а также возможности дифференциации между ними с помощью RAPD-маркеров.

Материалы и методы исследования

Материал. Генетический материал включал 9 гиногенетических линий сахарной свеклы, полученных при культивировании различных неоплодотворенных семян *in vitro* от нескольких донорных растений сорта Белорусская односемянная 69, и сам сорт.

Выделение ДНК. Использовали метод выделения тотальной ДНК из растений сахарной свеклы с помощью протеиназы К [15].

Методика RAPD-ПЦР. В опытах использовали произвольные праймеры длиной 10 нуклеотидов серии P- P28, P36, P38, P39, P43, P44, P46, P48, P49, P53 [8]. Их характеристика приведена в таблице 1. По наборам продуктов реакции, представляющих собой фрагменты ДНК разной длины, регистрировались различия между геномами близкород-

ственных линий. Такие фрагменты могли служить специфическими геномными маркерами и позволяли находить полиморфные локусы генома. Реакционная смесь для проведения RAPD – ПЦР объемом 20 мкл содержала деионизированную воду, 1 x ПЦР-буфер, 3 mM MgCl₂, по 200 мкМ дНТФ 4 типов, 0,25 мкМ праймера, 40 нг ДНК образца и 0,1 ед. Таq-полимеразы. Амплификацию с произвольными праймерами проводили, используя прибор «MJ Mini Personal Thermal Cycler BIO-RAD» в режиме: первая денатурация 94°C – 2 мин 12 сек, один цикл с отжигом праймера при 39°C 2 мин и элонгацией 72°C 2 мин, затем 35 циклов с профилем (94°C 40 сек, 47°C – 1 мин 40 сек, 72°C 1 мин 30 сек) с последней элонгацией в течение 7 мин при 72 °C.

Таблица 1

Характеристика произвольных RAPD-праймеров, использованных для выявления полиморфизма ДНК между близкородственными генотипами сахарной свеклы

Праймер	Последовательность	GC состав, %	Размер ПЦР фрагментов, п. н.
P28	5'-CAAACGTCGG-3'	60	550-1500
P36	5'-CCG AATTCGC-3'	60	490-1000
P38	5'-GATACGTTGTC-3'	46	500-800
P39	5'-CCAGTTCGCC-3'	70	550-1500
P43	5'-AGTCAGCTGC-3'	60	350-1500
P44	5'-GGACCCCGCC-3'	90	470-1500
P46	5'-GGTTGGGGAG-3'	70	370-1400
P48	5'-GCGGTGCTCG-3'	80	530-1500
P49	5'-GACAGCCTAC-3'	60	320-1200
P53	5'-GTCTAAGTCG-3'	50	830-3000

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием в трис-боратном буфере в течение 3,5 часов при напряжении

80 В в двух-трех повторностях. Спектры полученных амплифицированных фрагментов ДНК фотографировали в ультрафиолетовом свете. Для определения длины фрагментов

использовали маркер молекулярной массы (M) 100 bp + 1,5 Kb DNA Ladder (Fermentas). На основе полос с хорошим разрешением, соответствующих фрагментам ДНК размером в диапазоне в основном 350 – 1500 п.н., и только для праймера P53 – до 3000 п.н., которые полностью воспроизводились, составляли би-

нарные матрицы по каждому из праймеров, в котором отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме. Для построения дендрограммы использовали компьютерную программу TREECON [16] с расчетом значений бутстрепа [17].

Результаты и обсуждение

Исследовали близкородственный линейный материал сахарной свеклы, который был получен методами культивирования *in vitro* неоплодотворенных семяпочек растений сорта сахарной свеклы Белорусская односемянная 69 (2х). Всего было проанализировано 9 линий гиногенетического происхождения, среди которых растения пяти были репродуцированы из семян, а четыре были представлены растениями, культивируемыми *in vitro*. К первой группе относились: линия Белорусская 69-I от одного из трех селекционных компонентов сорта и ее две производные – облученная на стадии семян дозой 300 Грэй линия Белорусская 69-I 300Gu и линия Белорусская 69-I-7(4), а также линия Белорусская 69-3 и ее производная Белорусская 69-3(5). Линия Бел 69-3 была представлена растениями, расклонированными приемами микроклонального размножения *in vitro* от единичного растения №3, пересаженными в грунт и размноженными на изолированном участке для получения семян. Ко второй группе относились линии Белорусская 69 – 3(7), Белорусская 69 – 3(12), Белорусская 69 – 3(14) и Белорусская 69 – 3(15). Особенностью этих четырех гиногенетических линий являлось то, что они были индуцированы в культуре *in vitro* позже других линий и поэтому не прошли ни одного цикла семенной репродукции на момент анализа, как остальные исследованные линии, поэтому образцы их ДНК выделяли из листьев культивируемых *in vitro* растений.

Контроль был представлен диплоидным сортом-стандартом для Беларуси – Белорусская односемянная 69. ДНК линий были представлены смесью образцов ДНК листьев от 10 растений (bulk), а сорта – смесью от 20 растений, а при оценке внутрисортовой изменчивости – 20 образцами ДНК листьев от 20 индивидуальных растений. Проведенный ранее на гиногенетических линиях цитофотометри-

ческий анализ показал, что при регенерации из неоплодотворенных семяпочек донорного диплоидного растения сахарной свеклы возникают в основном гаплоидные побеги, но в 8-10% случаев регенерируют исходно диплоидные, т.е. гетерозиготные, побеги [18]. В рассматриваемой выборке гиногенетических линий такой гетерозиготной линией оказалась только линия Бел 69 – 3(5), все остальные линии были зафиксированы на начальных этапах формирования *in vitro* как гаплоидные. Линии, прошедшие циклы семенной репродукции, были диплоидными. Линии, представленные культивируемыми растениями, были миксоплоидными, включающими в разных соотношениях как гаплоидные клетки, так и удвоенные гаплоидные клетки ($x + xx$).

Среди упомянутых ранее работ [7-10], в которых RAPD маркеры у свеклы были применены для целей таксономической характеристики ее видов, при картировании генов устойчивости к нематоде, ризомании, окраски гипокотили и односемянности плодов, наиболее близким по поставленной нами задаче дифференциации генотипов свеклы было исследование авторов из Великобритании о возможности идентификации сортов сахарной свеклы с помощью RAPD фингерпринтинга [10]. В нем 17 растений 7 сортов (по 2-3 отдельных растения от каждого сорта) были проанализированы с применением 10 случайных праймеров, а затем для 15 растений от 2 сортов сахарной свеклы была оценена внутри- и межсортовая изменчивость по 5 лучшим праймерам, выявившим наибольшее количество полиморфных RAPD локусов. В наших опытах была оценена возможность дифференциации между близкородственными генотипами сахарной свеклы – гиногенетическими линиями, полученными в культуре неоплодотворенных семяпочек *in vitro* расте-

ний сорта Белорусская односемянная 69 (2х) и самим сортом, при использовании 10 случайных декамерных RAPD праймеров, а внутрисортовая изменчивость сорта определена на основе оценки полиморфизма ДНК в RAPD локусах спектров индивидуальных растений выборки. Были определены праймеры – Р 28, Р 43, Р 44, Р 48 и Р 53, применение которых позволило детектировать полиморфные локусы.

Электрофоретические спектры, полученные в результате ПЦР с остальными 5 праймерами у исследованных гиногенетических линий сахарной свеклы были однотипными. Продукты ПЦР представляли фрагменты амплификации размером от 320 п.н. до 3000 п.н., количество фрагментов амплификации в спектрах линий варьировало в зависимости от праймера от 3 до 15 (рисунки 1 и 2).

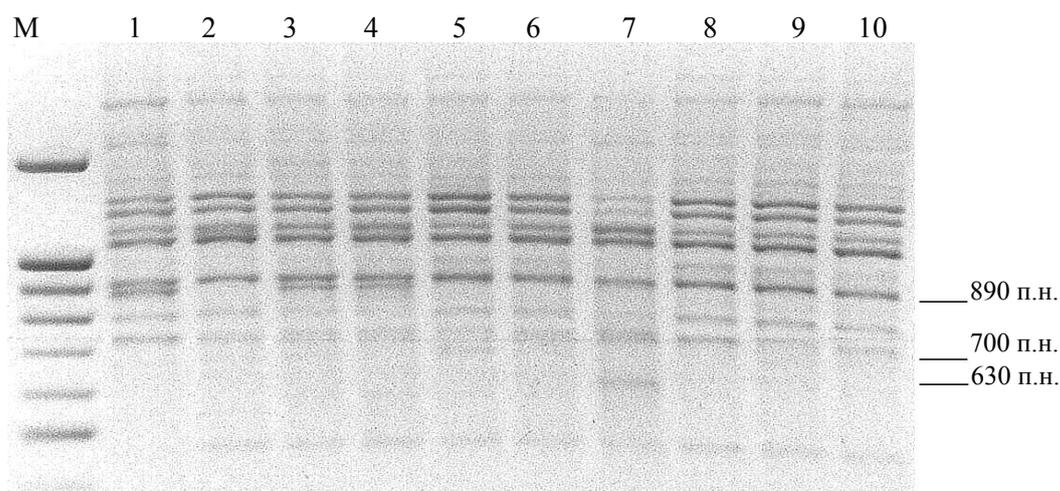


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК гиногенетических линий и сорта сахарной свеклы Белорусская односемянная 69 (2х) с праймером Р 44.

Обозначения: М- маркер 100 bp+1,5Kb; 1- Бел 69 (2х) сорт, 2- Бел 69 – I -7(4) 02 г, 3- Бел 69 – I, 4- Бел 69- I 300Gy, 5- Бел 69- 3, 6- Бел 69- 3 (5), 7- Бел 69- 3 (7), 8- Бел 69- 3 (12), 9- Бел 69- 3 (14), 10- Бел 69- 3 (15).

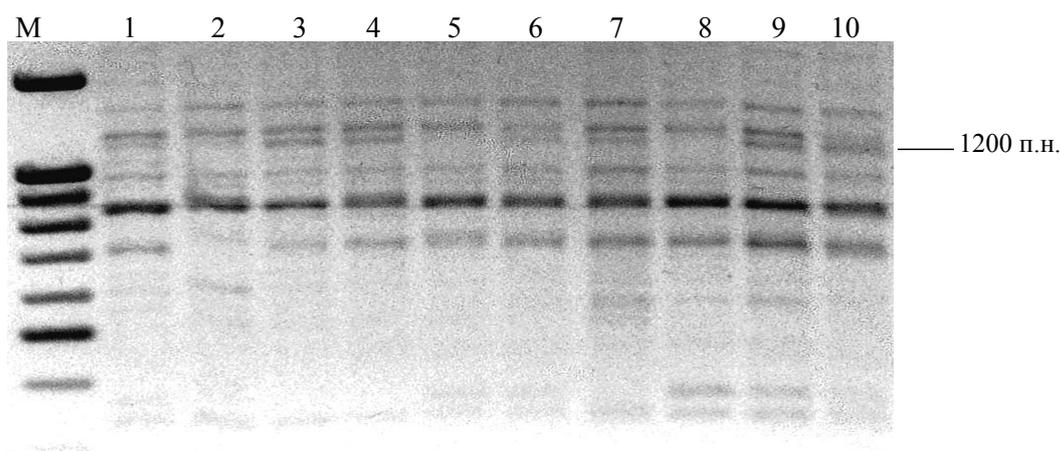


Рис. 2. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации ДНК гиногенетических линий и сорта сахарной свеклы Белорусская односемянная 69 (2х) с праймером Р 53.

Обозначения: М- маркер 100 bp+1,5Kb; 1– Бел 69 (2х) сорт, 2– Бел 69–I-7(4) 02 г, 3 – Бел 69–I, 4 – Бел 69- I 300Gy, 5 – Бел 69-3, 6 – Бел 69-3 (5), 7 – Бел 69-3(7), 8 – Бел 69-3(12), 9 – Бел 69-3(14), 10 – Бел 69-3(15).

На приведенных электрофореграммах отмечены позиции полиморфных локусов и их размеры в парах нуклеотидов: 890, 700 и 630 п.н. при амплификации с праймером Р44 и 1200 п.н. – с праймером Р 53.

Количество полиморфных локусов, встречающихся в электрофоретических спектрах линий и сорта изменялось от двух до семи. Уровень полиморфизма ДНК в RAPD локусах варьировал от 20 до 77,7%. Всего в данной выборке было исследовано 53 RAPD-локуса, 18 из которых были полиморфными. Таким образом, средний уровень полиморфизма RAPD локусов среди исследованных генотипов сахарной свеклы составил 33,9%.

Кроме того, в ходе анализа в ряде случаев были обнаружены полученными методом RAPD уникальные полосы-ампликоны, характерные для отдельных генотипов. На-

пример, при использовании в ПЦР праймера Р 28 линия Белорусская 69-3(15) имела в спектре фрагменты ДНК размером 1500 п.н. и 550 п.н., линия Бел 69-3(7) – ампликон размером 950 п.н., при амплификации с праймером Р 43 у линии Белорусская 69-3(15) задокументирован уникальный ампликон размером 550 п.н., а линии Бел 69-3(12) – ампликон размером 450 п.н.

На основании полученных данных по 53 RAPD локусам, характеризующих степень генетического сходства/различия изученных близкородственных генотипов сахарной свеклы была построена дендрограмма (рисунок 3). На ней отмечены все значения бутстрепа (вероятности формирования кластера), хотя топология дерева в участках со значениями бутстрепа менее 50 % не может считаться достоверно установленной.

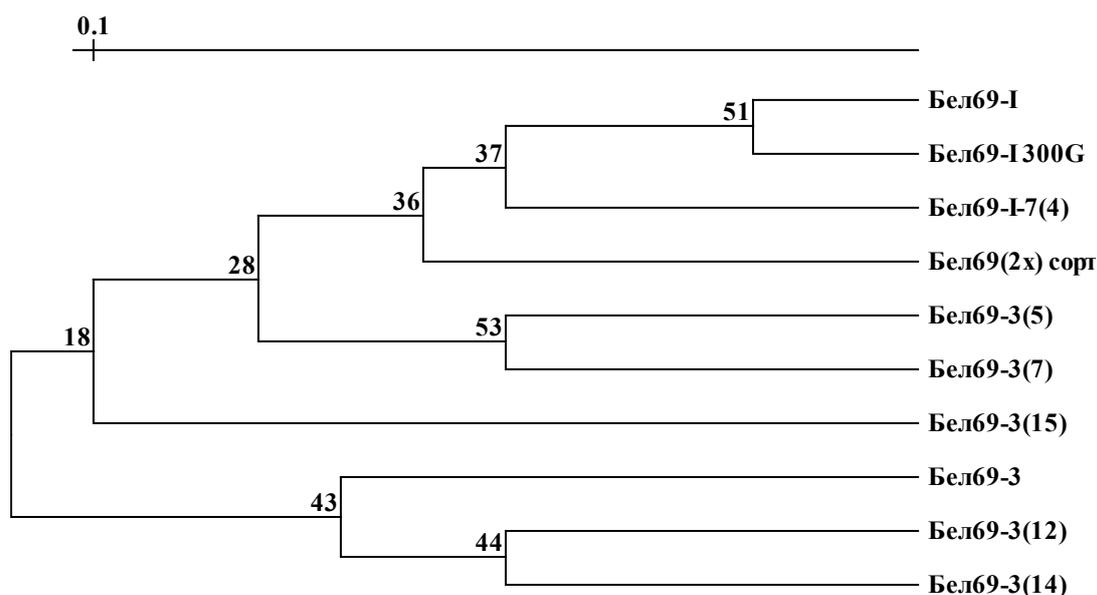


Рис. 3. Дендрограмма, отражающая генетическое сходство между исследованными гиногенетическими линиями, полученными на основе диплоидного сорта сахарной свеклы Белорусская односемянная 69.

Из дендрограммы следует, что диплоидная гетерозиготная гиногенетическая линия Бел 69-3(5) кластеризовалась со значением бутстрепа 53% с миксоплоидной линией Бел 69-3(7), в которой присутствовали диплоидные (удвоенные гаплоидные) клетки и гаплоидные клетки. Гаплоидные линии Бел-3(12) и Бел-3(14) образовали кластер со значением бутстрепа 44%, и это представляется логич-

ным, поскольку обе эти линии были взяты для анализа еще на ранней стадии формирования *in vitro*. При построении дендрограмм на основании данных по другим типам ДНК маркеров, например, SSR маркеров, на более репрезентативных выборках, включающих линейный и гибридный материал сахарной свеклы разного уровня ploidy, полученный из генетически отдаленных источ-

ников, нами также было отмечено формирование с высокой вероятностью кластеров из генотипов одинакового уровня ploidyности – гаплоидов, тетраплоидов [19]. Тем не менее, в данном опыте третья исходно гаплоидная линия Бел 69-3(15) не попала в один кластер с другими гаплоидами. Образец Бел 69-3, являющийся родительской формой для 5 гиногенетических линий, также достоверно не вошел в общий кластер ни с гаплоидными, ни с диплоидными/миксоплоидными $xx+x$ линиями, индуцированными на его основе. Другой кластер (бутстреп 51%) по результатам RAPD анализа объединил две линии Бел-I и Бел-I 300Gu, каждая из которых была сформирована из семяпочечных регенерантов от нескольких растений селекционного компонента I сорта Белорусская односемянная 69, представляющего собой отселектированную по ряду технологических характеристик популяцию сорта. Третья линия Бел 69 I-7(4) была индуцирована из единичной семяпочки одного растения этого компонента сорта и, по-видимому, была более выровненной по сравнению с двумя другими линиями, созданными на более широкой генетической основе. Она располагается на

дендрограмме рядом с ними, но в общий кластер не вошла (бутстреп 37%).

Расположение дерева с кластерами и масштаб «генетической близости – генетической отдаленности» (0.1) указывает на близкое родство между всеми представленными образцами. При использовании SSR маркеров на больших выборках, включающих и линии, и гибриды сахарной свеклы, было показано, что генотипы, прошедшие стадию семенной репродукции, не «смешивались» с образцами, которые этой стадии не прошли [19]. При RAPD анализе эта тенденция просматривается, но не является очевидной. Для сорта Белорусская односемянная 69, воспроизводимого семенами, образцы ДНК могли быть сформированы по-разному – как из смеси листьев 20 растений, так и как из листьев популяции 20 индивидуальных растений. Таким образом, появилась возможность оценить его внутрисортную изменчивость, используя апробированные RAPD праймеры. На рисунке 4 приведены спектры 10 растений этой выборки, полученные при разделении в геле продуктов амплификации с праймером P 48 с отмеченными полиморфными RAPD локусами.

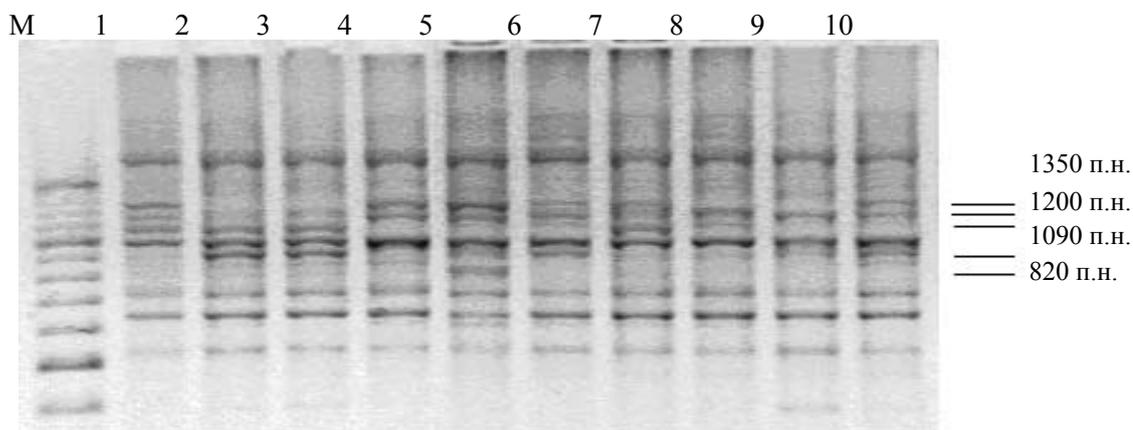


Рис. 4. RAPD-спектры индивидуальных растений сорта сахарной свеклы Белорусская односемянная 69, полученные при использовании в ПЦР праймера P 48

Обозначения: M – маркер 100 bp+1.5Kb; 1-10 образцы ДНК индивидуальных растений сорта Белорусская односемянная 69. Отмечены позиции полиморфных локусов и их размеры, в п.н.

Средний уровень полиморфизма ДНК в RAPD-локусах при популяционном анализе («б» вариант, таблица 2) сорта Белорусская односемянная 69 при использовании 5 праймеров составил 44.6%, причем по трем прай-

мерам P43, P44 и P48 из 5 соотношение полиморфных локусов к проанализированным было выше, чем при использовании образцов ДНК – смесей («а» вариант, таблица 2). Средний уровень полиморфизма ДНК в RAPD-

локусах в этом случае составил 36,3%. Кроме того, при оценке внутрисортовой изменчивости методом популяционного анализа дополнительную информацию внес праймер P39, с его помощью были выявлены 12 RAPD локусов, 4 из которых оказались полиморфными. Спектры фрагментов ДНК, амплифицированных с помощью этого праймера для других генотипов свеклы при использовании ДНК-смесей не включали полиморфные локусы, в том числе при повторном воспроизведении.

Невысокую воспроизводимость результатов, обусловленную повышенной чувствительностью к условиям реакции (концентрации ионов магния, соотношению праймер/матрица, температурному режиму) следует отнести к недостаткам метода. В экспериментах на близкородственных генотипах сахарной свеклы для получения воспроизводимых

спектров электрофоретическое разделение амплифицированных фрагментов ДНК в агарозном геле проводилось 2-3 раза, а в ряде случаев амплификация проводилась повторно. RAPD метод имеет и другие особенности: многие праймеры дают разные продукты амплификации, которые могут иметь одинаковую электрофоретическую подвижность, и, следовательно, их трудно различить при использовании обычной техники электрофореза; малейшие загрязнения препарата ДНК могут вызвать артефакты, связанные с амплификацией чужеродной ДНК. Предполагается, что изменение RAPD-спектра, т. е. исчезновение или появление новой полосы ДНК, отражает различные изменения генома, например, мутацию в участках, узнаваемых праймером, или делецию/инсерцию в промежутке между такими участками [20].

Таблица 2

Характеристика RAPD-спектров 20 растений сорта сахарной свеклы Белорусская односемянная 69, полученных при использовании 5 праймеров, выявивших полиморфные RAPD локусы при разных вариантах формирования образца ДНК (а- смесь растений и б-индивидуальные растения)

Праймеры	P28		P43		P44		P48		P53	
	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б
Количество проанализированных локусов	9	9	15	15	12	9	10	16	7	7
Количество полиморфных локусов	7	7	3	4	3	3	3	9	2	2
Уровень полиморфизма при «а» и «б» вариантах образца ДНК, %	77,7	77,7	20,0	26,6	25,0	33,3	30,0	56,3	28,6	28,6
Средний уровень полиморфизма на праймер, %	77,7		23,3		29,2		43,2		28,6	

RAPD-маркеры наследуются как доминантные, то есть фрагменты амплификации ДНК из гетерозигот не отличаются от фрагментов одной из родительских форм. Этот недостаток является особенно существенным в генетическом анализе, так как при оценке расщеплений выявляются не все классы, что существенно

ограничивает получаемую информацию. Лишь изредка наблюдается кодоминантность RAPD-маркеров, которая связана с перемещением или появлением нового участка связывания с праймером, чаще всего в результате инверсий и делеций [20]. В настоящей работе ампликоны рассматривались как доминантные маркеры.

Заключение

С использованием набора маркеров была исследована вариабельность более 50 RAPD локусов генома у близкородственных генотипов сахарной свеклы - гиногенетических линий, полученных в культуре неоплодотворенных семян *in vitro* растений сорта Белорусская односемянная 69 (2х) и у самого сорта. Апробированы 10 произвольных декамерных праймеров и отобраны 5 из них, позволяющих выявить полиморфные локусы и уникальные ампликоны, лежащие в основе оценки генетического сходства/различия и возможности дифференциации у близких в генетическом отношении генотипов свеклы. Выявление специфических фрагментов амплификации у трех линий из девяти исследованных в полученных RAPD спектрах дает определенное основание для использования этого метода молекулярного анализа для генотипирования данного материала сахарной свеклы. Представляется очевидным, однако, что количество использованных праймеров серии P, позволивших детектировать полиморфные RAPD локусы у исследованных генотипов, было недостаточным для того, чтобы замаркировать все образцы свеклы данной выборки. Отмечена тенденция по кластеризации линий одного происхождения (компонент I сорта Белорусская односемянная 69), одного уровня пloidности (гаплоидных) и

в зависимости от варианта репродукции линий (семенами или микроклонированием *in vitro*), подтвержденная ранее данными микросателлитного анализа [19]. По-видимому, генотипирование близкородственного генетического материала сахарной свеклы с помощью RAPD маркеров возможно при условии: а) использования больших (30-50) выборок образцов ДНК индивидуальных растений, представляющих ее линии и сорта, поскольку у перекрестноопыляемой свеклы при семенной репродукции могут встречаться генетические "загрязнения", и б) скрининга их с помощью большого количества (50-200) произвольных RAPD праймеров, т.е. при проведении широкомасштабных популяционных исследований. Средний уровень полиморфизма ДНК в RAPD-локусах при популяционном анализе сорта Белорусская односемянная 69 при использовании 5 праймеров составил 44,6%.

Мы выражаем благодарность старшему научному сотруднику лаборатории нехромосомной наследственности Института М.Г.Синявской за оказанную методическую помощь при организации экспериментов.

Работа была выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь (проект № Б07М-224).

Список использованных источников

1. Гостимский, С.А. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений / С.А. Гостимский, З.Г. Кокаева, В.К. Боброва // Генетика. – 1999. – Т. 35, №11. – С. 1538-1549.
2. Оганисян, А.С. Маркирование видов и сортов картофеля с помощью метода RAPD-PCR / А.С. Оганисян, Е.З. Кочиева, А.П. Рысков // Генетика. – 1996. Т. 32, № 3. – С. 448-451.
3. Дорохов, Д.Б. Использование полимеразной цепной реакции для идентификации генотипов томата / Д.Б. Дорохов // Изв. АН. РМ. Сер. биол. и хим. наук. – 1993. – №4. – С.19-22.
4. Сиволап, Ю.М. Использование продуктов полимеразной цепной реакции для картирования генома ячменя (*Hordeum vulgare* L.) / Ю.М. Сиволап, Р.Н. Календарь, В.П. Нецветаев // Генетика. – 1997. – Т. 33, №1. – С.53-60.
5. Сиволап, Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов мягкой пшеницы методами RAPD- и SSRP-анализа / Ю.М. Сиволап, Е.А. Топчиева, С.В. Чеботарь // Генетика. – 2000. – Т. 36, №1. – С. 44-51.
6. Сиволап, Ю.М. RAPD-анализ молекулярно-генетического полиморфизма подсолнечника / Ю.М. Сиволап, А.Е. Солоденко, В.В. Бурлов // Генетика. – 1998. – Т. 34, №2. – С. 266-271.
7. Shen Y. The taxonomic characterization of annual Beta germplasm in a genetic resources collection using RAPD markers /Y.Shen, H.J.Newbury and B.V. Ford-Lloyd // Euphytica. – 1996. – Vol. 91. P. 205-212.
8. Uphoff H. / Random Amplified Polymorphic

- DNA (RAPD) Markers in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.): Mapping the Genes for Nematode Resistance and Hypocotyl Colour / H.Uphoff and G. Wricke // Plant Breeding. – 1992. – Vol. 109. – P. 168-171.
9. Barzen E. An extended map of the sugar beet genome containing RFLP and RAPD loci/ E. Barzen, W. Mechelke, E. Ritter, E. Schulte-Kappert // Theor. And Appl. Genet. – 1995 – Vol. 90. – P. 189-193.
10. Ford-Lloyd B.V. The Use of RAPD for the Identification of Sugar Beet Varieties / B.V. Ford-Lloyd., M.Munthali, and H.J.Newbury// Journal of Sugar Beet Research. October-December 1993. – Vol. 30, N 4. – P. 291-298.
11. Sabir A. / Determination of genetic stability using isozymes and RFLPs in beet plants regenerated *in vitro* / A. Sabir, G. Todd, J. Catty and B. V. Ford-Lloyd // Theor. Appl Genet. – 1992. Vol. 84, N 1-2. – P. 113-117.
12. Schmidt, T.DNA-fingerprinting in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) – identification of double-haploid breeding lines / T. Schmidt, K.Boblenz, M.Metzlaff, D.Kaemmer, K.Weising, G.Kahl // Ther. Appl. Genet. – 1993. –Vol. 85. – P. 653-657.
13. Nagamine, T./Use of restriction fragment length polymorphism to fingerprint beets at the genotype and species/ T. Nagamine, G. A. Todd, K. P. McCann, H. J. Newbury and B. V. Ford-Lloyd // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol. 78, N 6. – P. 847-851.
14. Svirshchevskaya A.M./ Production and Performance of Gynogenetic Sugarbeet lines / Svirshchevskaya A.M., Dolezel J. // J. of Sugar Beet Research (USA). October-December, 2000. – Vol.37, N 4. – P.117-133.
15. Plaschke J. / Detection of genetic diversity in closely related wheat using microsatellite markers / J.Plaschke, M.W. Ganal, M.S. Roder // Theor. Appl.Genet. – 1995. – Vol. 91 – P.1001-1007.
16. Van de Peer, Y. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for Microsoft Windows environment / Y.Van de Peer, R. De Wachter // Comput. Appl. Biosci. – 1994. – Vol. 10.– P. 569-570.
17. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – V. 38. – P. 783-791.
18. Svirshchevskaya A.M., Dolezel J. Karyological characterization of sugar beet gynogenetic lines cultured *in vitro*. // J. of Applied Genetics. – 2001. – Vol. 42, N 1. – P.21-32.
19. Malyshev S. SSR markers assessment of genetic diversity in sugar beet lines/Sergey Malyshev,Anna Svirshchevskaya, and Nikolai Kartel / Modern Variety Breeding for Present and Future Needs (2008). Eds. J.Projens & M.L.Badenes. Editorial Universidad Politecnica de Valencia. – 2008. Valencia, Spain. – P. 176-177.
20. Williams, J.G.K. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers/ J.G.K. Williams, M.K. Hanafe, J. A. Rafalski, S.V. Tingey // Method Enzymol. – 1993. – Vol. 218. – P. 704-740.

Дата поступления статьи 10 апреля 2009 г.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАЗОВОГО И РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНОМОВ В ХОДЕ ФОРМИРОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНОМА ТЕТРАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Анализ структуры геномов различных таксономических групп с применением молекулярных и компьютерных технологий привел к переосмыслению роли полиплоидии в эволюции живого мира. В результате чрезвычайно возрос интерес к изучению различных аспектов этого способа видообразования. Итогом многочисленных исследований, проведенных на естественных и искусственно синтезированных растительных объектах [1-15], явился стремительный прорыв в наших знаниях о генетических механизмах, обеспечивающих гармоничное функционирование объединенных в одном ядре двух или более дивергентных геномов.

Следует, однако, заметить, что все эти работы касаются геномных преобразований у первичных полиплоидных форм, послуживших лишь начальным этапом эволюции посредством полиплоидии. В дальнейшем главную роль в микроэволюционной дифференциации большинства полиплоидных видов играли гибридизационные процессы, позволившие объединить в одном виде генетическую изменчивость нескольких предковых популяций и обеспечившие тем самым невероятную пластичность генома вторичных гибридогенных таксонов [16].

Примером такой дифференциации является генезис полиплоидных видов *Triticum* и *Aegilops*, все многообразие которых возникло в результате скрещиваний небольшого числа первичных тетраплоидов, имевших один общий (базовый) геном (A, U, или D) и различавшихся вторыми геномами [17]. Данный тип скрещиваний порождает широкий диапазон изменчивости гибридных форм, возникающей

за счет формирования рекомбинантных цитотипов, образованных разными комбинациями генетического материала вторых геномов, при сохранении стабильности базового генома. Кроме того, по свидетельству Feldman & Levy, появление у аллополиплоидных видов геномных структур, образованных рекомбинантным и базовым геномами, облегчает их дальнейшую гибридизацию и ведет к обмену генетическим материалом между уже сформированными рекомбинантными геномами. В результате такого постоянного перераспределения аллелей создается изобилие доступной отбору генетической изменчивости, что делает совместно произрастающие аллополиплоидные популяции активными центрами эволюции [18].

Несмотря на столь значимый вклад описанных гибридизационных событий в процесс видообразования полиплоидных видов злаков, подтвержденный экспериментальными доказательствами существования в природе рекомбинантных геномов, это направление эволюции семейства *Poaceae* до сих пор остается вне поля зрения исследователей. Между тем, выяснение закономерностей формирования и функционирования таких геномов может пролить свет на многие неясные моменты эволюционного становления семейства, углубив одновременно наши представления о путях дивергенции его представителей. Кроме того, полученная информация послужит основой для разработки более эффективных подходов к преобразованию генетической структуры зерновых культур с целью интрогрессии хозяйственно-полезных признаков, что свидетельствует не только о теоретической, но и практической

значимости подобных исследований.

Исходя из этого нами на примере тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов ($2n=4x=28$; геном A/BRR) было проведено детальное изучение процесса формирования и функционирования рекомбинантных геномов.

Материалы и методы

Материалом для изучения процесса формирования хромосомного состава 4х-тритикале послужили гибридные популяции яровых тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов ПРАТ12, ПРАТ16 и ПРАТ72, полученные в результате скрещивания гексаплоидных тритикале (AABBRR, $2n=6x=42$) с диплоидной аллоплазматической рожью *S. cereale* L. ($2n=2x=14$) [20]. Каждая из трех форм представляет собой потомство гибрида F_2 , репродуцируемое в условиях свободного опыления. Анализ хромосомного состава индивидуальных растений в ряду поколений (F_6 , F_{10} , F_{14} – F_{17}) выполнялся при помощи метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) [21]. В каждом поколении анализировалась выборка не менее чем из 30 растений.

Для изучения особенностей функциониро-

вания генетических систем пшеницы и ржи на хромосомном уровне изложены в предыдущей публикации [19]. Данная статья посвящена особенностям взаимодействия базового и рекомбинантного геномов в составе гибридного генома тетраплоидных тритикале.

вания генетических систем пшеницы и ржи в геноме пшенично-ржаных амфидиплоидов использованы озимые тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоиды F_1 (ABRR, $2n=4x=28$), синтезированные на основе скрещивания гексаплоидных тритикале (AABBRR, $2n=6x=42$) с диплоидной аллоплазматической рожью *S. cereale* L. ($2n=2x=14$), и коллекция линий 4х-тритикале с различными вариантами пшеничного компонента кариотипа [22].

Идентификацию индивидуальных хромосом пшеницы и ржи в мейозе осуществляли с использованием разработанной нами модификации С-бэндинга [23]. Для каждой гибридной формы на стадии метафазы I анализировалось не менее 30 материнских клеток пыльцы.

Ядрышкообразующие локусы на хромосомах визуализировались методом Ag-NOR окрашивания [24].

Результаты и обсуждение

Исследование процесса формирования хромосомного состава тетраплоидных тритикале в ряду поколений (F_6 , F_{10} , F_{14} – F_{17}) показало, что в ходе стабилизации их кариотипа рекомбинации генетического материала наблюдаются исключительно в пшеничном компоненте [19]. Геном ржи сохраняет свою целостность, не подвергаясь каким-либо структурным изменениям и интрогрессии генетического материала со

стороны геномов пшеницы. Более того, в отдельных случаях наблюдается замещение части генетического материала пшеницы на таковой ржи, о чем свидетельствует появление у озимых форм дополнительной пары 5R хромосом, заместившей гомеологичную ей пару хромосом пшеницы, а также обнаруженная нами у яровых форм хромосомная перестройка 5AS.5AL-5RL (рис. 1).

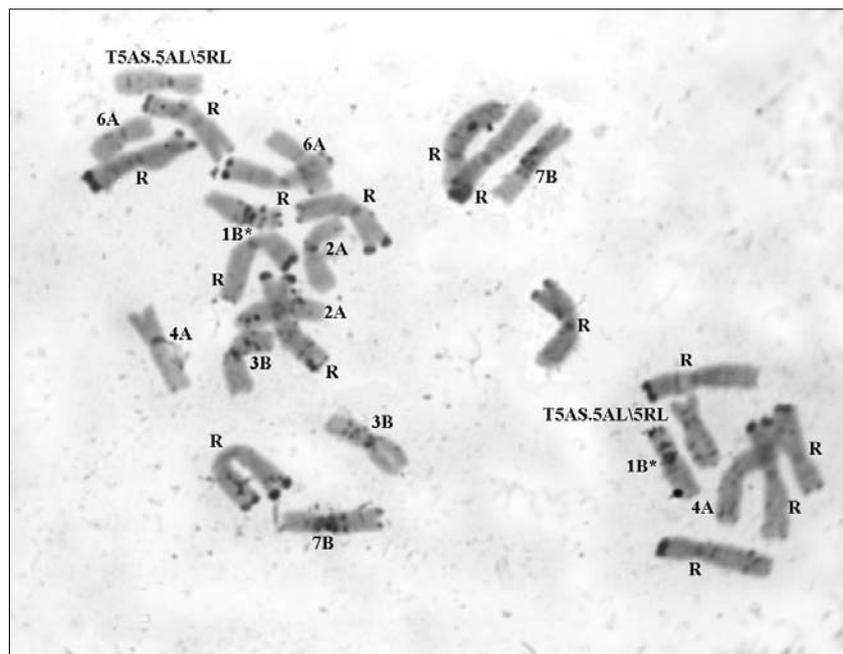


Рис. 1. Кариотип тетраплоидного тритикале с хромосомной перестройкой 5AS.AL/5RL.

Аналогичные случаи интрогрессии генетического материала ржи в пшеничный миксогеном тетраплоидных тритикале были выявлены в озимом материале польской селекции [25], что свидетельствует о закономерном характере этих событий.

Отмеченная стабильность генома ржи на структурном уровне благоприятствует проявлению его доминирующей роли в генетическом контроле различных жизненно важных процессов у гибридных форм, в частности, процесса формирования гамет. Как было показано в ходе анализа микроспорогенеза у гибридов F_1 тетраплоидных тритикале (таблица 1) [26], доминирование генетических систем ржи в регуляции спаривания хромосом в мейозе приводит к

- спариванию гомеологичных хромосом пшеницы и, как следствие этого, правильной их сегрегации во время деления клетки, повышающей шанс образования функциональных гамет и обеспечивающей этим частичную фертильность гибридов ранних поколений и дальнейшее воспроизводство тетраплоидных форм;

- обмена генетическим материалом между гомеологами, что обеспечивает образование межгеномных рекомбинаций не только на уровне целых хромосом, но и их сегментов.

Преимущественная экспрессия генома ржи проявляется и на уровне морфологии растений, причем не только в ранних поколениях гибридов. Особенно наглядно это прослеживается при анализе таких признаков, как высота растений, длина главного колоса, число колосков в колосе (таблица 2), а также морфотип колоса. Как видно на рисунке 2а, несмотря на огромную вариацию хромосомного состава пшеничного компонента кариотипа, растения в популяциях, как правило, характеризуются однотипными колосьями, более близкими по морфологии ко ржи. В то же время в линейном материале, который репродуцируется в условиях принудительного самоопыления, различия по морфологическим признакам между растениями с разными вариантами кариотипа проявляются более контрастно, что, по нашему мнению, является следствием инцухт-депрессии генома ржи (рис. 2б,в).

Таблица 1

Средняя частота хромосомных конфигураций в метафазе I мейоза у тетраплоидных тритикале F₁

Гибрид	Пшеничный компонент кариотипа				Ржаной компонент кариотипа				
	биваленты		униваленты	всего	униваленты	биваленты		всего	униваленты
	закрытые	открытые				закрытые	открытые		
№14	0	0,83±0,12 [0-3]	0,83±0,12 [0-3]	12,35±0,25 [8-14]	4,55±0,20 [2-7]	2,18±0,20 [0-4]	6,73±0,08 [5-7]	0,55±0,16 [0-4]	
№81	0,06±0,03 [0-1]	1,02±0,40 [0-3]	1,04±0,40 [0-4]	11,84±0,29 [8-14]	2,90±0,14 [1-5]	3,70±0,15 [1-6]	6,60±0,09 [5-7]	0,80±0,17 [0-4]	
№73	0,03±0,03 [0-1]	0,90±0,20 [0-4]	0,92±0,09 [0-4]	12,13±0,40 [6-14]	4,60±0,25 [2-7]	2,33±0,24 [0-5]	6,93±0,05 [6-7]	0,13±0,09 [0-2]	
№75	0	0,64±0,16 [0-2]	0,64±0,16 [0-2]	12,71±0,31 [10-14]	3,64±0,28 [0-6]	2,89±0,28 [0-6]	6,54±0,10 [6-7]	0,93±0,19 [0-2]	
X	0,02±0,02	0,85±0,13	0,86±0,14	12,26±0,29	3,92±0,48	2,78±0,28	6,70±0,20	0,60±0,40	

Таблица 2

Характеристика некоторых морфологических признаков тетраплоидных тритикале и их родительских форм

Поколение, комбинация скрещивания, сорт	Высота растений, см	Длина главного колоса, см	Количество колосков в колосе	Количество цветков в колосе
F ₄ (6ТА206 x AR)	139,45 ± 7,38	16,0 ± 0,25	27,90 ± 0,49	3 - 4
F ₄ (6ТА472 x AR)	141,05 ± 1,02	15,80 ± 0,32	28,45 ± 0,61	3 - 4
F ₅ (6ТА206 x AR)	127,12 ± 2,88	15,06 ± 0,35	27,70 ± 0,44	3 - 4
F ₅ (6ТА472 x AR)	133,80 ± 1,08	17,20 ± 0,39	32,30 ± 0,78	3 - 4
6ТА206	118,77 ± 2,78	10,20 ± 0,27	22,50 ± 0,46	3 - 4
6ТА472	105,30 ± 2,24	10,20 ± 0,26	24,20 ± 0,40	3 - 4
AR	136,73 ± 3,34	8,63 ± 0,22	28,37 ± 0,72	2

Примечание: символом AR обозначена аллоплазматическая рожь.



Рис.2. Морфотип колоса 4х-тритикале: а) гибридная популяция; б) линия ПРАТ12(12); в) линия ПРАТ 72(40).

Выявленное доминирование генома ржи в экспрессии различных признаков тетраплоидных тритикале не означает, однако, отсутствия влияния на его функциональную активность со стороны рекомбинантного генома пшеницы.

О том, что такое влияние имеет место уже в F₁ гибридов, свидетельствуют результаты, полученные в ходе анализа поведения хромо-

сом в метафазе I мейоза тетраплоидных форм. Как видно из данных таблицы 1, количество бивалентов, образованных хромосомами ржи в составе АВRR гибридов, колебалось от 5 до 7, составляя в среднем 6,7 бивалента на МКП. При этом наблюдалось незначительное преобладание закрытых бивалентов над открытыми, что несвойственно сортам ржи и говорит

о снижении плотности синапсиса хромосом. Даже у полученной нами аллоплазматической ржи количество закрытых бивалентов было существенно выше (4,89). Все это указывает на наличие у гибридов F_1 дестабилизирующего действия пшеничного компонента кариотипа на процесс спаривания хромосом ржи.

Но особенно ярко взаимодействие базового и рекомбинантного геномов у тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов проявляется на уровне экспрессии рРНК локусов хромосом.

Функционирование этих локусов, расположенных в районах вторичных перетяжек спутничных хромосом, приводит к образованию ядрышек, представляющих собой место синтеза рибосомных РНК и рибосом, на которых происходит сборка полипептидных цепей [27]. Поэтому по функциональной активности ЯОР хромосом можно судить об уровне метаболизма клетки в целом [28], от которого, в свою очередь, зависит функциональная активность не только клеток отдельных тканей, но и всего организма. Этим объясняется повышенный интерес к исследованию экспрессии генов рРНК у различных организмов и в особенности у естественных и экспериментально полученных отдаленных гибридов.

Наиболее детально число, локализация на хромосомах и функциональная активность ядрышкообразующих (ЯО) локусов, а также их взаимодействие изучены у видов рода *Triticum*. Установлено, что диплоидные виды пшеницы содержат две пары ЯО хромосом: 1А и 6А, *Aegilops squarrosa* (донор D генома мягких пшениц) – одну пару: 5D, а *Aegilops speltoides* (один из возможных доноров генома В) – две пары: 1В и 6В. Однако у тетраплоидных пшениц функционируют только рРНК локусы на 1В и 6В хромосомах, а локусы на хромосомах А генома супрессированы. У гексаплоидной пшеницы полностью подавлена активность

рРНК локуса хромосомы 6А и частично – 1А и 5D, в то время как активно функционируют, образуя довольно крупные ядрышки, ЯОР хромосом 1В и 6В [29-34]. Таким образом, по уровню функциональной активности рРНК локусов хромосомы гексаплоидной пшеницы распределяются следующим образом: 6В – 1В – 5D – 1А. При этом ЯО локусы первых двух хромосом принято называть главными, а остальных – минорными.

Присутствие главных ЯО хромосом пшеницы в составе геномов пшенично-ржаных гибридов и амфидиплоидов вызывает полное подавление активности единственного ЯО локуса ржи, расположенного на хромосоме 1R [35, 36].

У тетраплоидных тритикале, как показали проведенные нами исследования, наблюдается дифференциальная активность рРНК локуса ржи, уровень которой определяется присутствием в рекомбинантном геноме тех или иных ЯО хромосом пшеницы (таблица 3).

Так, при наличии главных ЯО хромосом пшеницы – двух 6В у линии ПРАТ10(1) или двух 1В у линий ПРАТ196(3) и ПРАТ72(6/3) – рРНК локус ржи находится в неактивном состоянии и не визуализируется при помощи Ag-NOR-окрашивания (рисунок 3, 4).

Присутствие хромосомы 6В в одной дозе (у линии ПРАТ10 (2) с гетерогеномным составом 6-й гомеологической группы) также супрессирует ЯОР ржи. В то же время при моносомном состоянии хромосомы 1В в некоторых клетках наблюдается минорная активность рРНК локусов ржи (рисунок 5).

Полное восстановление экспрессии ЯОР ржи происходит при элиминации (в ходе становления рекомбинантного генома) из кариотипа тетраформ главных ЯО хромосом пшеницы (рисунок 6), что свидетельствует об обратимости сайленсинга рРНК локусов и, следовательно, его эпигенетической природе.

Таблица 3

Количество и хромосомная принадлежность функционально активных ядрышковых организаторов в кариотипах тетраплоидных тритикале

Линия	Хромосомный состав пшеничного компонента кариотипа*	Количество исследованных клеток	Функционально активные ЯОР	
			число	принадлежность
ПРАТ 381	1A ^T 2B3B4A5A6A7B	15	2	1R
ПРАТ72(6/4)	1A ^T 2A3B4A5A6A7A/7B	8	2	1R
ПРАТ 237(2)	1A2A3B4A5A6A7B	10	2	1R
ПРАТ 72(6/3)	1B 2A ^T 3B4A5A6A7B	11	2	1B
ПРАТ 196(3)	1B ^T 2A3A4A5A6A7B	10	2	1B
ПРАТ237(1)	1A/1B ^T 2A3B4A5A6A7B	10	1**	1B
ПРАТ 72(6/1)	1A ^T /1B2A3B4A5A6A7A/7B	9	1**	1B
ПРАТ 196(2)	1A/1B ^T 2A3A4A5A6A7B	5	1**	1B
ПРАТ10(1)	1A ^T 2B3B4B5B 6B 7A	30	2	6B
ПРАТ10(2)	1A ^T 2B3B4B5B6A/ 6B 7A	30	2	6B

Примечания:

* Геном ржи у всех линий представлен полностью (2n =14)

** В некоторых клетках наблюдается минорная активность ЯОР на хромосоме 1R

Жирным шрифтом выделены ядрышкообразующие хромосомы.

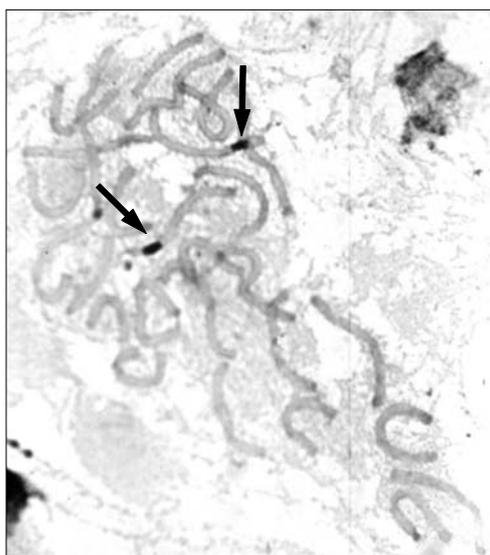


Рис. 3. Метафазная пластинка линии ПРАТ 10(1).

Примечание:

Стрелками обозначены активные ЯОР на хромосомах 6B.

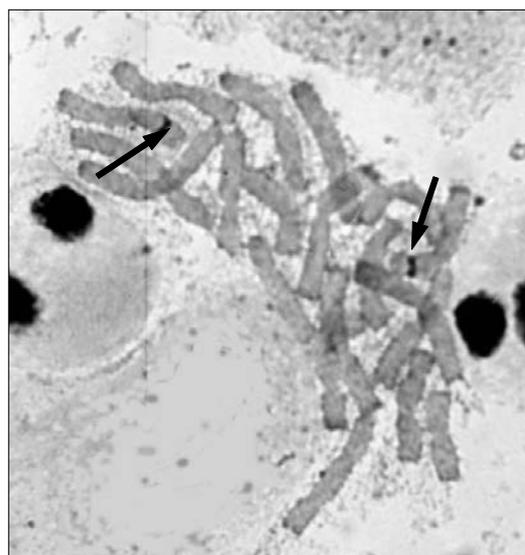


Рис.4. Метафазная пластинка линии ПРАТ 196(3).

Примечание:

Стрелками обозначены активные ЯОР на хромосомах 1B.

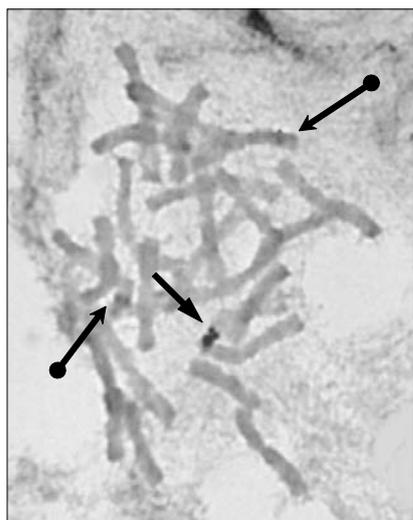


Рис. 5. Метафазная пластинка линии ПРАТ 237(1).

Примечания:
 → обозначен активный ЯОР на хромосоме 1В;
 ●→ обозначены ЯОР на хромосомах 1R.

Механизм этого явления в настоящее время установлен. Показано, что замолкание рРНК локусов связано с метилированием ДНК и деацетилизацией гистонов [37-40].

ЯОР хромосомы 1А, который проявляет ми-



Рис. 6. Метафазная пластинка линии ПРАТ 381.

Примечание:
 Стрелками обозначены активные ЯОР на хромосомах 1R.

норную активность в геноме мягкой пшеницы, у тетраплоидных тритикале не функционирует, что, по-видимому, является следствием супрессирующего эффекта уже со стороны хромосомы 1R.

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии сложных взаимодействий между базовым и рекомбинантным геномами тетраплоидных тритикале. При этом не только геном ржи, выступающий в роли базового, оказывает модифицирующее действие на функциональную

активность хромосом пшеницы, но и рекомбинантный пшеничный геном способен влиять на экспрессию генома ржи. Все эти взаимодействия отражают процесс становления в гибридном организме единой генетической системы регуляции жизненно важных процессов.

Список использованных источников

1. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. Changes in low-copy non-coding DNA sequences / B. Liu [et al.] // *Genome*. – 1998. – Vol. 41, № 2. – P. 272-277.
2. Liu, B. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. Changes in low-copy coding DNA sequences / B. Liu, J.M. Vega, M. Feldman // *Genome*. – 1998. – Vol. 41, № 4. – P. 535-542.
3. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat / E. A. Salina [et al.] // *Genome*. – 2004. – Vol. 47, № 5. – P. 860-867.
4. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploid and derived wheat polyploids / I.G. Adonina [et al.] // *Genome*. – 2006. – Vol. 49, № 8. – P. 1023-1035.
5. Ozkan, H. Allopolyploidy induced rapid ge-

nome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group / H. Ozkan, A.A. Levy, M. Feldman // *Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13, № 8. – P. 1735-1747.

6. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat / H. Shaked [et al.] // *Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13, № 8. – P. 1749-1759.

7. Akhunov, T.D. Mechanisms and rates of birth and death of dispersed duplicated genes during the evolution of a multigene family in diploid and tetraploid wheats / T.D. Akhunov, A.R. Akhunova, J. Dvorak // *Molecular Biology and Evolution*. – 2006. – Vol. 24, №2. – P. 539-550.

8. Chen, Z.J. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids / Z.J. Chen, Z. Ni // *BioEssays*. – 2006. – Vol. 28, №3. – P. 240-252.

9. Adams, K.L. Evolution of duplicated gene expression in polyploid and hybrid plants / K.L. Adams // *J. of Heredity*. – 2007. – Vol. 98, №2. – P. 136-141.

10. Lynch, M. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes / M. Lynch, J.S. Conery // *Science*. – 2000. – Vol. 290, № 5494. – P. 1151-1155.

11. Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat / P. He [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 52, № 2. – P. 401-414.

12. Mochida, K. Discrimination of homoeologous gene expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags / K. Mochida, Y. Yamazaki, Y. Ogihara // *Mol. Genet. Genomics*. – 2004. – Vol. 270, № 5. – P. 371-377.

13. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing / K.L. Adams [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2003. – Vol. 100, № 8. – P. 4649-4654.

14. Adams, K.L. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid / K.L. Adams, R. Percifield, J.F. Wendel // *Genetics*. – 2004. – Vol. 168, № 4. – P. 2217-2226.

15. Bottley, A. Homoeologous gene silencing in hexaploid wheat / A. Bottley, G.M. Xia, R.M.D. Koebner // *Plant J.* – 2006. – Vol. 47, №6. – P. 897-906.

16. Soltis, P.S. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids / P.S. Soltis, D.E. Soltis // *Proc. National Academy of Sciences USA*. – 2000. – Vol. 97, №13. – P. 7051-7057.

17. Zohary, D. Hybridization between amphidiploids and the evolution of polyploids in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group / D. Zohary, M. Feldman // *Evolution*. – 1962. – Vol. 16, № 1. – P. 44-61.

18. Feldman, M. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes / M. Feldman, A.A. Levy // *Cytogenet. Genome Res.* – 2005. – Vol. 109, № 1-3. – P. 250-258.

19. Дубовец, Н.И. Рекомбинантный геном как источник внутривидовой дивергенции полиплоидных злаков / Н.И. Дубовец [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. Сб. научн. тр. Т.8. – Минск, 2008. – С.105-112.

20. Бормотов, В.Е. Тетраплоидные тритикале (создание, цитогенетическое изучение и использование в селекции) / В.Е. Бормотов [и др.] – Минск: Наука и техника, 1990. – 136 с.

21. Бадаев, Н.С. Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшеницы и тритикале / Н.С. Бадаев [и др.] // Докл. Акад. Наук СССР. – 1983. – Т.273., №4. – С. 994-996.

22. Сычева, Е.А. Тетраплоидные тритикале как объект для цитогенетических исследований. I. Изучение роли индивидуальных хромосом пшеницы в регуляции мейотического спаривания / Е.А. Сычева, Н.И. Дубовец // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2003. – №2. – С.52-55.

23. Сычева, Е. А. Методика дифференциального окрашивания мейотических хромосом злаков / Е.А. Сычева // Весці Акад. Навук Беларусі. Сер. Біял. Навук. – 2000. – №2. – С. 44-46.

24. Амосова, А.В. Стабильность и изменчивость ядрышкообразующих районов хромосом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / А.В. Амосова. – Москва, 1993. – 23 с.

25. Lukaszewski, A.J. Chromosome constitution of tetraploid triticale / A.J. Lukaszewski [et al.] // *Z. Pflanzenzuchtg.* – 1984. – Bd.93, №3. – S. 222-236.

26. Сычева, Е.А. Цитогенетические осо-

бенности формирования и функционирования рекомбинантного генома тетраплоидных тритикале: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Е.А. Сычева. – Минск, 2005. – 163 с.

27. Ченцов, Ю.С. Общая цитология / Ю.С. Ченцов. – 2-е изд. – М. : Изд-во Моск. ун-та, 1984. – 352 с.

28. Соболев, М.А. Роль ядрышка в реакциях растительных клеток на действие физических факторов окружающей среды / М.А. Соболев // Цитология и генетика. – 2001. – №3. – С. 72-84.

29. Appels, R. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals / R. Appels, W.L. Gerlach, I.S. Dennis // Chromosoma. – 1980. – Vol.78, №3. – P. 293-311.

30. Dubcovsky, J. Ribosomal RNA loci: Normands in the Triticeae genomes / J. Dubcovsky, J. Dvorak // Genetics. – 1995. – Vol.140, №4. – P. 1367-1377.

31. Flavell, R.B. Ribosomal RNA genes of homeologous chromosomes of groups 5 and 6 in hexaploid wheat / R.B Flavell., M. O'Dell // Heredity. – 1976. – Vol.37, №4. – P. 377-385.

32. Flavell, R.B. The genetic control of nucleolus formation in wheat / R.B Flavell., M. O'Dell // Chromosome. – 1979. – Vol. 71, №2. – P. 135-152.

33. Martini, G. The control of nucleolus volume in wheat, a genetic study at three developmental stages / G.Martini, R. Flavell // Heredity. – 1985. – Vol. 54, №2. – P. 111-120.

34. Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat *Triticum dicoccoides* / R.B. Flavell [et al.] // Israel. Mol. Biol. Evol. – 1986. – Vol.3, №6. – P. 547-558.

35. Lacadena, J.R. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver staining procedure / J.R. Lacadena [et al.] // Theor. and Appl. Genet. – 1984. – Vol. 67, №2-3. – P. 207-213.

36. Neves, N. Nucleolar dominance in triticales: control by unlinked genes / N. Neves [et al.] // Chromosome Res. – 1997. – Vol.5, №2. – P. 125-131.

37. Lawrence, R.J. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance / R.J. Lawrence [et al.] // Mol Cell. – 2004. – Vol.13, №4. – P. 599-609.

38. Chen, Z.J. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance / Z.J. Chen, C.S. Pikaard // Genes and Development. – 1997. – Vol.11, №16. – P. 2124-2136.

39. Comai, L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants / L.Comai // Plant. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 43, №2-3. – P. 387-399.

40. Shaked, H. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat / H. Shaked [et al.] // Plant Cell. – 2001. – Vol.13, №8. – P. 1749-1759.

Дата поступления статьи 30 сентября 2009 г.

О. М. Люсиков, И. А. Гордей

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГАМЕТ РАЗЛИЧНОГО ХРОМОСОМНОГО СОСТАВА У РЖАНО-ТРИТИКАЛЬНЫХ ГИБРИДОВ F_1 (RRABR, $5X=35$)

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Создание новой зерновой культуры тритикале ($\times Triticale = Triticum \times Secale$) на основе отдаленной гибридизации и экспериментальной аллоплоидии – одно из крупнейших достижений современной генетики. Научно-практические результаты в области селекции тритикале ставят их в ряд наиболее востребованных по хозяйственному значению злаковых культур. Основное хозяйственное назначение тритикале – зернофуражное, однако область использования продукции тритикале постоянно расширяется (хлебопечение, пивоварение, биотопливо, кормовые добавки и др.). В настоящее время мировые посевные площади под тритикале превышают 5,5 млн. га, в том числе, в Беларуси – более 400 тыс. га [1].

В связи с отсутствием естественного центра формо- и видообразования, важнейшей особенностью селекции тритикале и расширения их биологического разнообразия является необходимость систематического синтеза новых форм на генетической основе современных высокопродуктивных сортов пшеницы и ржи. В настоящее время актуальна разработка новых, более эффективных методов создания тритикале с использованием результатов современных молекулярно-цитогенетических исследований.

С целью усиления экспрессии генома ржи и повышения адаптивности тритикале нами проведены исследования по созданию нового типа ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум [2,3,4,5]. Показано, что ключевым этапом формирования генома секалотритикум является мейоз у ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$). От эффективности методов восстановления фертильности, количества и хромосомного состава функциональных гамет отдаленных гибридов F_1 непосредственно зависит результативность синтеза и генетическое разнообразие получаемых амфидиплоидов.

Изучение мейоза у ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$) представляет особый интерес. При взаимодействии генетических систем контроля мейоза пшеницы и ржи у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 с уникальным геномным составом в условиях цитоплазмы ржаного типа возникают специфические особенности цитогенетических механизмов спорогенеза.

В представленной статье приведены результаты исследований генетических факторов и цитологических механизмов формирования гамет различного хромосомного состава у ржано-тритикальных гибридов F_1 в процессе создания секалотритикум.

Материал и методы

Материалом для исследований послужили 40 комбинаций гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$) и амфидиплоиды $F_1(BC)_1$, полученные от скрещиваний тетраплоидной ржи (RRRR, $2n=4x=28$) с гексаплоидными тритикале (AABBRR,

$2n=6x=42$) с целью создания секалотритикум (RRAABB, $2n=6x=42$). Для гибридизации использовали 6 перспективных сортов ржи – Пуховчанка, Новосибирская, Верасень, Сяброўка, Калінка, Радзіма и 8 форм трити-

кале – Л-374, Л-303, NE 83Т, 845Т, CHD 888, Ugo, Полус, Samsun.

Анализ ключевых стадий микроспорогенеза и фертильности пыльцы у гибридов F₁ проводили на давленных препаратах пыльников, окрашенных 2%-м раствором ацетокармина в 45%-й уксусной кислоте [6]. Анализировали по 5 – 10 растений гибридов F₁ на комбинацию. У всех полученных амфиплоидов F₁(BC)₁ определяли числа хромосом в

соматических клетках [6].

Изучение цитологических препаратов проводили на микроскопе Leica DM RXA2 с оптикой Leica HCX Plan APO. Цифровые микрофотоснимки получали при увеличении 40× и 100× (иммерсия) с использованием камеры Leica DC-350 с разрешением 3132×2328 точек.

Полученные данные обработаны статистически методом анализа вариации по качественным признакам [7].

Результаты и обсуждение

Гибриды F₁ от скрещивания тетраплоидной ржи (RRRR, 2n = 4x = 28) с гексаплоидными тритикале (AABBRR, 2n = 6x = 42) представляют собой 35-хромосомные пентаплоиды со сложным геномным составом (R^SR^SA^{Tr}B^{Tr}R^{Tr}, 5x=35). Они не являются истинными полигаплоидами и представляют собой уникальную ядерно-цитоплазматическую конструкцию – имеют цитоплазму ржи, а в состав их ядра, наряду с гаплоидными наборами хромосом А- и В-геномов пшеницы, входит R-геном ржи в триплоидном состоянии. Цитоплазматические геномы пластид и митохондрий (плазмон) и два ядерных R-генома получены от тетраплоидной ржи, один ржаной R- и два пшеничных А- и В-гаплогенама происходят от тритикале. Геномный состав и особенности взаимодействия генетических систем

исходных видов определяют специфичность протекания мейоза, различную функциональность и хромосомный состав гамет у ржано-тритикальных гибридов F₁, генетическое разнообразие и цитологическую стабильность амфиплоидов последующих поколений и ржано-пшеничных амфидиплоидов секалотритикум [4,5].

Теоретически, при условии строгой гомологии спаривания хромосом, у пентаплоидов RRABR, 5x=35 должны образовываться 7 тривалентов (RRR), или 7 бивалентов и 7 унивалентов R-хромосом (RR+R) и 14 унивалентов хромосом А- и В-геномов.

Результаты цитогенетического анализа ключевых стадий микроспорогенеза у ржано-тритикальных гибридов F₁ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Нарушения в мейозе у ржано-тритикальных гибридов F₁ (RRABR, 5x=35)

Стадия мейоза	Изучено		% аномальных клеток по стадиям мейоза с типом нарушений										
	всего		тип нарушений	всего	с участием количества хромосом и микроядер								
					1	2	3	4	5	6	7	>7	
M I	1409	84,9	Периферийные	\bar{X}	84,9	7,9	9,9	10,6	20,5	9,9	6,7	7,2	12,9
				lim	53,9-98,5	2,6-18,6	5,6-18,4	2,6-21,1	4,7-23,7	2,0-23,7	5,3-20,7	2,0-18,2	2,8-39,3

Продолжение таблицы 1

А I	1570	75,4	Забегающие	\bar{X}	29,2	0,6	0,6	0,9	1,0	1,1	1,1	3,4	20,4	
				<i>lim</i>	27,0-84,0	0,0-4,1	0,0-4,1	0,0-2,7	0,0-2,8	0,0-3,2	0,0-5,7	0,0-8,9	0,0-82,1	
			Отстающие	\bar{X}	67,9	16,6	15,1	9,4	8,0	6,8	3,6	2,7	5,8	
				<i>lim</i>	23,8-96,4	2,4-25,0	7,1-21,1	3,6-21,9	1,1-15,6	4,5-16,1	1,1-12,1	1,4-10,7	2,8-42,9	
М II	1482	73,8	Периферийные	\bar{X}	73,8	22,3	18,8	13,4	6,5	5,7	2,6	1,6	1,0	
				<i>lim</i>	52,8-90,9	10,3-34,9	12,5-29,1	4,4-29,8	3,1-11,7	1,6-12,5	0,9-9,6	0,4-6,9	0,6-3,5	
А II	2429	93,4	Отстающие	\bar{X}	83,9	6,6	10,4	8,0	10,5	15,9	20,3	5,0	14,6	
				<i>lim</i>	86,0-100,0	3,6-11,4	2,1-15,8	2,1-11,9	8,2-17,8	7,9-18,1	8,0-54,8	1,8-12,6	5,6-33,4	
			Асинхронность	\bar{X}	7,4-									
				<i>lim</i>	2,1-18,2									
Т	7280	71,2	Микроядра	\bar{X}	68,6	18,5	15,1	9,0	19,0	3,1	2,1	0,6	1,1	
				<i>lim</i>	43,4-90,8	6,5-45,0	8,6-24,3	1,6-38,5	0,5-67,6	1,0-13,0	0,2-5,7	0,2-2,9	0,3-2,4	
MI - T	14170	77,1												

В прометафазе у ржано-тритикальных гибридов F_1 наблюдали униваленты непарных хромосом, кольцевые (закрытые) и линейные (открытые) биваленты, мультивалентные, чаще три- и тетравалентные, ассоциации хромосом (рис. 1а). К ранней метафазе I (MI)

мультиваленты обычно распадались.

Биваленты локализовывались в метафазной пластинке. Часть унивалентов также располагались на экваторе, а другие – симметрично экватору и на периферии клетки (рис. 1б).

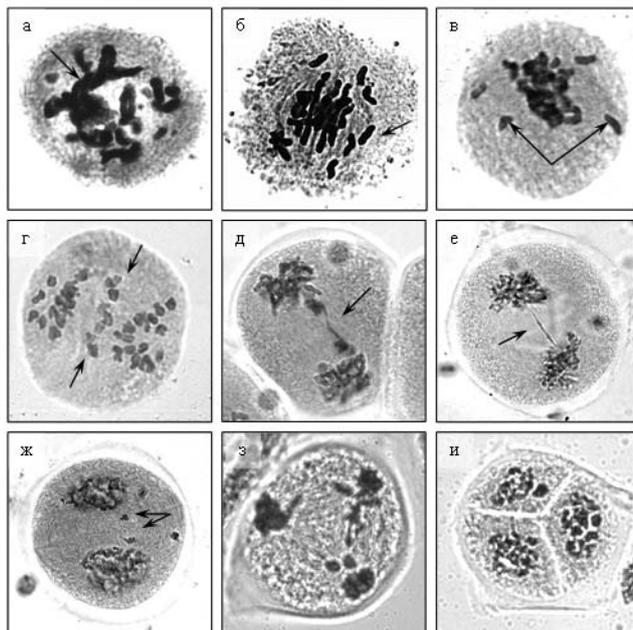


Рис. 4. Нарушения во втором делении мейоза у ржано-тритикальных гибридов F_1 .

а – асинхронное деление; б, в – отстающие хроматиды; г – мосты; д – задержка хромосом в области цитокинеза; е – микроядра в тетрадах; ж – отсутствие деления; з – неравномерное распределение хромосом (чМНГ); и – нередуцированная гамета.

В зависимости от комбинации скрещивания от 53,9 до 100%, в среднем около 85%

микроспороцитов пентаплоидов F_1 имели от 3 до 22, в среднем 10,6 унивалентов на

клетку. Причем около 70% микроспороцитов содержали не более 7 унивалентов, а в 50 % клеток обнаруживали по 1 – 5 унивалентов. Кольцевые и линейные биваленты присутствовали в среднем по 6 – 7 и 4 – 5

на клетку соответственно. Всего на микроспороцит приходилось до 15, в среднем – по 11 бивалентов. У 1% микроспороцитов наблюдали до 4, в среднем – по 1-2 тривалента, реже – тетраваленты.

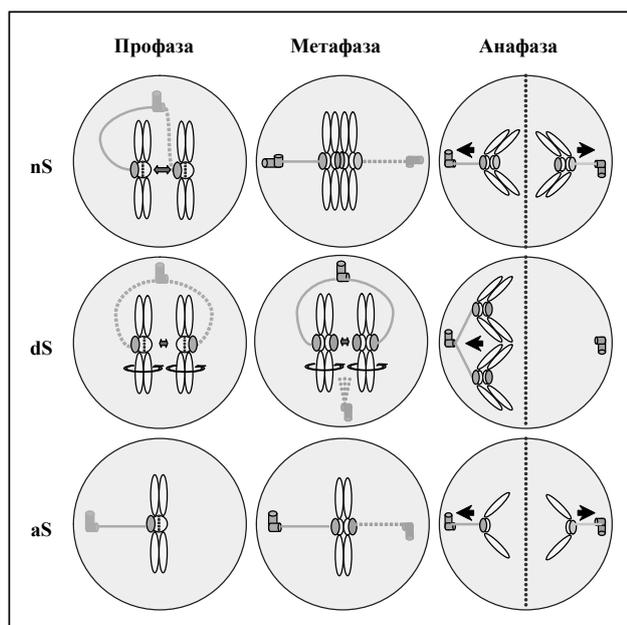


Рис. 2. Варианты взаимодействия хромосом в мейозе у ржано-тритикальных гибридов F_1 .

nS – нормальный синapsис;
dS – десинапсис; aS-асинапсис.

Различная частота и локализация в клетке унивалентных хромосом указывают на их разное происхождение. Непарные хромосомы, не вступающие в гомо- или гомеологичные контакты, являются истинными, или асинapтическими унивалентами. В МI они располагались на экваторе клетки в составе метафазной пластинки вместе с кольцевыми бивалентами гомологов и линейными бивалентами гомеологичных хромосом (рис. 1б, рис. 2 aS, nS). Унивалентные хромосомы, образующиеся при преждевременном распаде бивалентов (десинапсис), оказывались в симметричных экватору областях микроспороцита (рис. 1в, рис. 2 dS). Такие десинаптические униваленты (псевдоуниваленты) были, вероятно, представлены гомеологичными А- и В-хромосомами. Реже, вне оси деления на периферии клетки наблюдали унивалентные хромосомы, вероятно, с нарушениями образования кинетохоров или прикрепления микрофибрилл веретена.

Таким образом, формирование хромосомных ассоциаций в прометафазе мейоза у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 проис-

ходило путем нормального спаривания и синapsиса гомологичных (кольцевые биваленты) и гомеологичных хромосом (линейные биваленты), десинапсиса гомеологов (псевдоуниваленты) и при асинapsисе непарных хромосом (истинные униваленты). Полученные результаты приобретают особенное значение в связи с дальнейшими различиями полярной ориентации центромер и поведения в мейозе унивалентных хромосом различного генезиса и хромосом в составе гомо- и гомеологичных бивалентов.

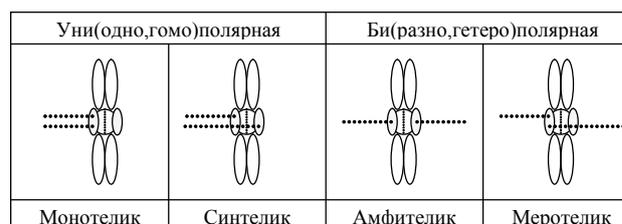


Рис. 3. Варианты полярной ориентации центромер хромосом перед делением.

Выделяют 4 типа монополярной (монотелик и синтелик) и биполярной (амфителик и меротелик) ориентации центромер (рис. 3) [8,9]. Монополярно ориентированы центромеры хромосом в составе бивалентов. Амфителик ориентация характерна для унивалентных мейотических и митотических хромосом. Меротелическое присоединение нитей веретена аномально. В делящихся клетках существуют специальные белковые факторы и механизмы для исправления ошибок полярной ориентации центромер [9,10,11]. Важно, что для исключения ошибок сегрегации хромосом образование кинетохоров и полярная ориентация центромер должны быть строго скоординированы во времени или порядком активации с процессами формирования клеточных центров и с образованием и прикреплением микрофибрилл веретена [9,10,11,12,13].

Возникновение различных типов полярной ориентации центромер, вероятно, связано с особенностями их синапсиса в прометафазе и объясняет наблюдавшиеся в анафазе первого деления мейоза (AI) у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 отличия в делении и распределении хромосом. Средняя частота аномальных мейоцитов в AI у пентаплоидов F_1 варьировала от 50 до 100 %. Гибриды F_1 от разных комбинаций скрещивания достоверно различались по соотношению типов деления хромосом.

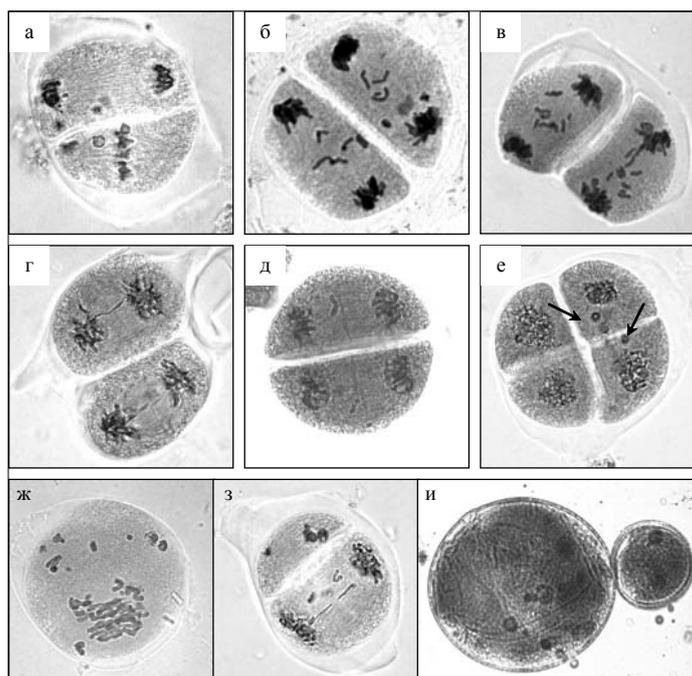
Хромосомы гомологичных (кольцевых) и гомеологичных (линейных) бивалентов и десинаптические униваленты (псевдоуниваленты) делились редукционно (без разделения на хроматиды). При этом с одинаковой частотой у амфигаплоидов F_1 разных комбинаций примерно в 30 % мейоцитов псевдоуниваленты симметрично отходили к полюсам ранее хромосом бивалентов ("забегания", рис. 1в). Следовательно, их центромеры были ориентированы монополярно. Биполярную ориентацию имели только центромеры истинных (асинаптических) унивалентов, которые входили в состав метафазной пластинки и делились эквационно на хроматиды (рис. 1б-д) позже бивалентов. Такие «отстающие» хромосомы встречались у 25-90 % клеток в зависимости от комбинации скрещивания. У 4,2% клеток

они образовывали хромосомные (рис. 1д) и хроматидные (рис. 1е) мосты и, задерживаясь в плоскости цитокинеза, нередко фрагментировались (рис. 1е, ж). В среднем около 25 % микроспороцитов имели забегающие и отстающие хромосомы одновременно.

Необходимо отметить, что у большинства пентаплоидов F_1 аномальные клетки в основной массе содержали более 7 забегающих и до 4 отстающих хромосом (соответственно 82 % и 75 % от общего количества клеток с нарушениями). Сопоставление этих данных с результатами изучения унивалентов в MI и забегающих хромосом в AI показывает, что у большинства ржано-тритикальных гибридов F_1 в среднем 3,8 унивалента на клетку входили в состав метафазной пластинки и претерпевали эквационное деление на хроматиды с задержкой деления на фоне бивалентов. Однако у гибридов F_1 ряда комбинаций скрещивания часто наблюдали более 4 отстающих хромосом. У них с относительно высокой частотой (до 11%) наблюдали задержку деления и сегрегации 7 унивалентных хромосом, возможно, принадлежащих одному геному (рис. 1г).

Забегающие и отстающие хромосомы обычно включались в телофазные ядра на стадии диад. Периферийно расположенные униваленты, случайным образом распределенные в клетке, пассивно захватывались формирующимися ядрами диад или образовывали микроядра. В ряде случаев в микроспороцитах наблюдали образование трехполюсного веретена деления (рис. 1з), вследствие чего в телофазе I наряду с диадами формировались триады микроспор (рис. 1и). В целом, на стадии телофазы I отмечали относительно невысокую частоту нарушений (в среднем 54 %). Лишь незначительное количество диад содержали 1 - 3, реже – до 5 микроядер. Около 2 % диад были представлены асимметричными по содержанию хроматина клетками, а 0,35% составляли триады. В единичных случаях встречались неразделившиеся клетки (монады).

Во втором делении у ржано-тритикальных гибридов F_1 наблюдали различные типы деления, распределения и элиминацию хромосом.



а – асинхронное деление; б, в – отстающие хроматиды;
г – мосты; д – задержка хромосом в области цитокинеза;
е – микроядра в тетрадах; ж – отсутствие деления;
з – неравномерное распределение хромосом (чМНГ);
и – нередуцированная гамета.

Рис. 4. Нарушения во втором делении мейоза у ржано-тритикальных гибридов F_1 .

В метафазе II (МII) от 50 до 100%, в среднем 74% клеток пентаплоидов F_1 в зависимости от комбинации скрещивания имели фрагменты хроматина вне метафазной пластинки. Вероятно, они утрачивали центромерную активность и не связывались с нитями веретена деления.

В анафазе II (АII) наблюдали повышение частоты аномалий (~95%) в сравнении с АI (~75%). Вероятно, хроматиды разделившихся эквационно в АI унивалентов, являлись источником нарушений во втором делении (рис. 4б-е). В АII такие хроматиды встречались в сестринских мейоцитах обычно в одинаковом количестве (табл. 1). Они не делились, либо делились аномально, задерживались в экваториальных областях (в среднем у 93,4 % клеток) и часто не включались в телофазные ядра, оставаясь в области цитокинеза (рис. 4б, в). У гибридов F_1 отдельных комбинаций скрещивания в 10-20 % клеток наблюдали отставания семи хромосом в сестринских мейоцитах (рис. 4в), что могло способствовать элиминации хромосом целого генома. Таким образом, эквационное деление унивалентов в АI способствовало элиминации генетического материала.

Необходимо подчеркнуть, что асинхронное деление ядер диад (рис. 4а), отмеченное только у 7,4% клеток, свидетельствовало об относительно невысокой генетической разбалансированности механизмов мейоза у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 . Следовательно, у них отсутствует генетический груз аномальных генов мейотического контроля (таких, например, как нарушение веретена деления), и основная масса наблюдаемых нарушений является результатом нормальной регуляции мейоза амфигаплоидного ядра отдаленных гибридов F_1 .

У 2-5 % клеток наблюдали мосты и фрагментацию хроматина (рис. 4г, д). Отстающие хромосомы с нарушениями сегрегации и фрагменты хроматина формировали микроядра в тетрадах микроспор (рис. 4е). Микроядра наблюдали в среднем у 68,6 % тетрад. Количество микроядер на тетраду варьировало от 1 до 18, но большинство (до 70 % от общего числа) составляли клетки микроспор с 1-4 микроядрами, что отражает характерный для пентаплоидов F_1 уровень элиминации 1-2 хромосом на микроспороцит. Общее количество аномалий на стадии тетрад микроспор (71 %) в сравне-

нии с анафазой II (95 %) снижалось. Вероятно, часть микроядер были скрыты в ядрах. Неразделившиеся клетки (монады, диады, триады) встречались крайне редко, что свидетельствует о низком уровне мейотической нередукции у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 .

Таким образом, результаты проведенных исследований показали ряд особенностей мейоза у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 :

- высокий уровень гомо- и гомеологического спаривания хромосом по формуле $10,6^I + 6,6^{II3} + 4,5^{IIo} + 0,7^{III}$ с образованием гомологами ржи динамической системы би-тривалентного синапсиса, варьирующий в зависимости от различных комбинаций скрещивания;

- различия в полярной ориентации центромер и делении (эквационное, редукционное и смешанное) хромосом в составе гомо- и гомеологических бивалентов, асинаптических унивалентных и псевдоунивалентных десинаптического происхождения;

- различия в распределении (равномерное, неравномерное, элиминация) хромосом, обуславливающие формирование гамет различного хромосомного и геномного состава.

Различия ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 разных комбинаций скрещивания по соотношению типов деления хромосом свидетельствуют, что полярная ориентация их центромер регулируется не только структурой (степенью гомологии) хромосом, но и специфичностью взаимодействия родительских генетических систем, контролирующей конъюгацию хромосом (спаривание, синапсис и рекомбинацию) в профазе мейоза [8]. Такие системы у ржи и пшеницы функционально отличаются: Ph-система полиплоидных пшениц контролирует строгость гомологии спаривания хромосом в профазе мейоза, а известные Su-гены ржи обеспечивают правильное прохождение всех этапов конъюгации хромосом независимо от протяженности участков их гомологии [14, 15, 16]. На разных негомеологических хромосомах ржи были локализованы различающиеся по силе гены-промоторы эквационного деления унивалентов P/Edu ($5R > 6R$ и $7R > 1R > 2R$), а на хромосоме пшеницы 5A – ингибитор I/Edu [17, 18]. Механизм действия, проявление в условиях ржаной и пшеничной цитоплазм, эволюционное значение Edu-генов (Equational division univalents genes) неизвестны [18].

Вероятно, системы мейотического контроля ржи (Su и др.), в отличие от генетических систем аллополиплоидной пшеницы (Ph и др.), эволюционно менее приспособлены поддерживать нормальное функционирование полигеномного ядра. У ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 цитоплазма и три ядерных генома ржи ослабляли экспрессию пшеничной Ph-системы контроля строгой гомологии конъюгации хромосом и уровень спаривания гомеологических хромосом у них возрастал. Полученные результаты согласуются с литературными данными о конкурентном повышении вероятности спаривания гомеологических хромосом при снижении уровня гомологического синапсиса [14, 15], в частности – о негативном воздействии ржаного генома на уровень гомологической конъюгации у тритикале [15]. Поэтому результат конкурентного взаимодействия генетических систем исходных видов у гибридов F_1 мог различаться в зависимости от специфичности комбинаций генотипов исходных форм ржи и тритикале.

Мы полагаем, что изначально мейотические хромосомы имеют монополярную ориентацию центромер. Имеются литературные данные о том, что монополярная связь хромосом с первичным клеточным центром сохраняется на протяжении всего клеточного цикла, за исключением отдельных моментов при делении клетки [19]. Возможно, синапсис дестабилизирует полярную связь хромосом с исходным клеточным центром. Система стабилизируется, когда одна из хромосом бивалента ориентируется к другому полюсу [10, 11]. При этом важно, что синапсис препятствует возникновению биполярной ориентации центромер отдельных хромосом в составе бивалентов, в связи с чем они сохраняют униполярную ориентацию. Поэтому амфителик-ориентируются только центромеры асинаптических и, возможно, самых ранних десинаптических унивалентов (рис. 2,5).

Преобладание в одних генотипах экспрессии пшеничных регуляторных генов (Ph, I/Edu и др.) способствовало у ржано-тритикальных гибридов F_1 преимущественному спариванию гомологических R-хромосом и ослабляло синапсис A- и B-гомеологов. Следовательно, с учетом вышесказанного, все хромосомы у них сохраняли монополярную ориентацию центромер и делились преимущественно редукционно, но

отдельные гомологи в составе бивалентов ориентировались к разным, а гомеологи и десинаптические униваленты – к одному полюсу.

Усиление в других генотипах экспрессии ржаного генома (Sy, P/Edu и др.) способствовало тесному синапсису и разнополяр-

ной ориентации в составе бивалентов как гомологов, так и гомеологов. Центромеры асинаптических унивалентов приобретали амфителик-ориентацию, определяющую в дальнейшем их преимущественно эквационное деление.

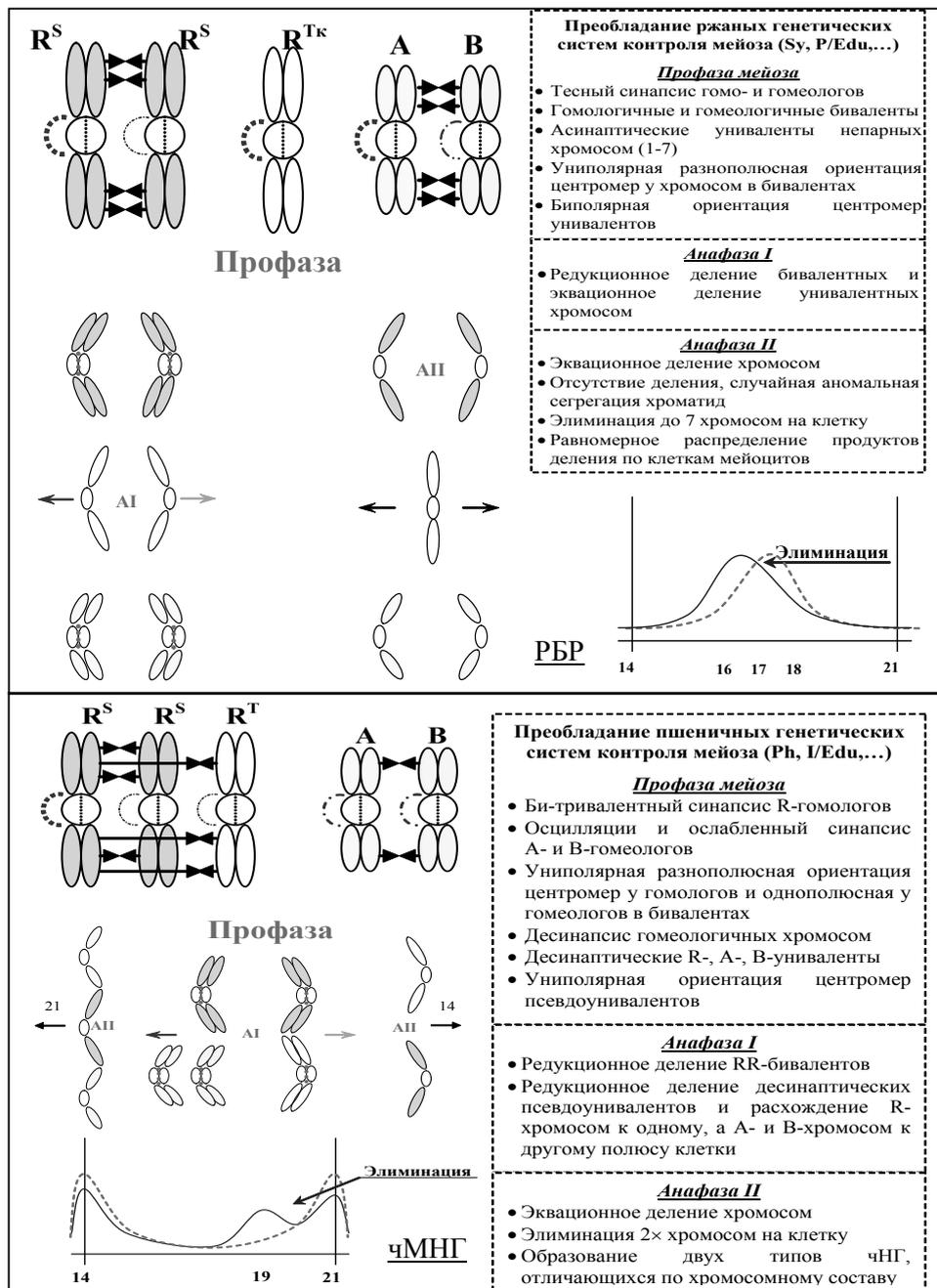


Рис. 5. Цитологические механизмы формирования гамет с различным хромосомным составом у ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$) РБР – механизм «равномерного биномиального распределения» чМНГ – механизм «частичной мейотической нередукции».

На основании анализа результатов проведенных цитогенетических исследований мейоза у ржано-тритикальных гибридов F_1 была постро-

ена цитологическая модель, описывающая 2 варианта гаметогенеза, различающиеся уровнем гомеологичной конъюгации, степенью синапсиса

и соотношением редукционного и эквационного типов деления унивалентных хромосом (рис. 5):

- **Механизм «равномерного биномиального распределения»** (РБР на рис. 5, 6) хромосом, реализующийся в гибридных генотипах ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 с преобладанием экспрессии ржаных генетических систем контроля мейоза (Sy, P/Edu и др.) над генами пшеницы (Ph-гены контроля гомологии конъюгации хромосом, I/Edu и др.). В подобных генотипах происходит формирование однородных по хромосомному составу гамет $7(R) + 7(A/B) + 1-7(R)$ в результате равномерного распределения хромосом в клетки мейоцитов в соответствии с правилом биномиального распределения.

- **Механизм «частичной мейотической нередукции»** (чМНГ на рис. 5, 6) в гибридных генотипах ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 с доминированием генетических систем пшеницы (Ph-гены, I/Edu и др.). В подобных генотипах в нормальный синяпсис вовлекаются только гомологичные хромосомы, а гомеологичные ассоциации нестабильны. В AI мейоза у них происходит исключительно редукционное деление, неравномерная сегрегация хромосом и формирование двух типов частично нередуцированных гамет (чНГ), сбалансированных по хромосомным наборам гаплогеномов исходных видов): 14-хромосомных ($7(R) + 7(R)$) и 21-хромосомных ($7(R) + 7(A) + 7(B)$).

Представленные цитологические механизмы гаметогенеза у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 являются крайними вариантами. В реальности наблюдали вызванные разными причинами отклонения и варьирование уровней бивалентной конъюгации и элиминации хромосом.

Анализ хромосомного состава гамет ржано-тритикальных гибридов F_1 проводили путем определения числа хромосом у растений амфиплоидов $F_1(BC)_1$ (рис. 7). Необходимо отметить, что в результате стабильной бивалентной конъюгации ржаных хромосом и регулярного деления RR-бивалентов все формирующиеся у гибридов F_1 гаметы с различным хромосомным составом получали полногеномный набор из 7 R-хромосом, чем объясняли их относительно высокую функциональность (жизнеспособность и фертильность).

Анализ варьирования растений ржано-пшеничных амфиплоидов $F_1(BC)_1$ по числу хромосом показал, что у большинства ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 с повышенной

в той или иной степени частотой формировались гаметы всех ожидаемых модальных классов (14-, 16-17-, 19- и 21-хромосомные). Однако встречаемость разнохромосомных гамет у гибридов F_1 конкретных комбинаций была обычно близка к одному из смоделированных вариантов или к их интегральному выражению (рис. 6). Уровень частичной мейотической нередукции у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 (формирование 21-хромосомных, геномно-сбалансированных гамет RAB, $3x=21$) составил в среднем 15,3% и достигал 30% в зависимости от комбинации скрещивания.

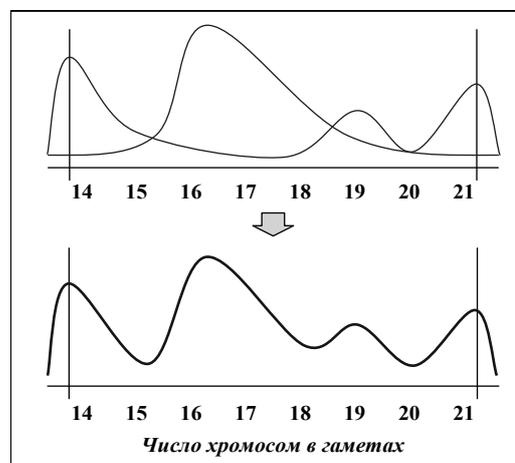


Рис. 6. Интегральная кривая распределения частот гамет с различным количеством хромосом согласно цитологической модели гаметогенеза у ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$).

Для сопоставления смоделированной и полученной экспериментально вариации гамет ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 по числу хромосом исходная кривая биномиального распределения (рис. 5) строилась для n , где n = общее количество проанализированных по числу хромосом растений амфиплоидов $F_1(BC)_1$. Результирующие кривые (РБР, чМНГ, суммарная) (рис. 5, 6) получали с сохранением значения площадей фигур с осью X.

Совпадение полученных экспериментально и смоделированных значений встречаемости гамет различного хромосомного состава у ржано-тритикальных пентаплоидов F_1 (рис. 7) дает основания считать предложенную модель цитологических механизмов гаметогенеза теоретически обоснованной с учетом выявленных цитогенетических факторов и специфичности мейоза.

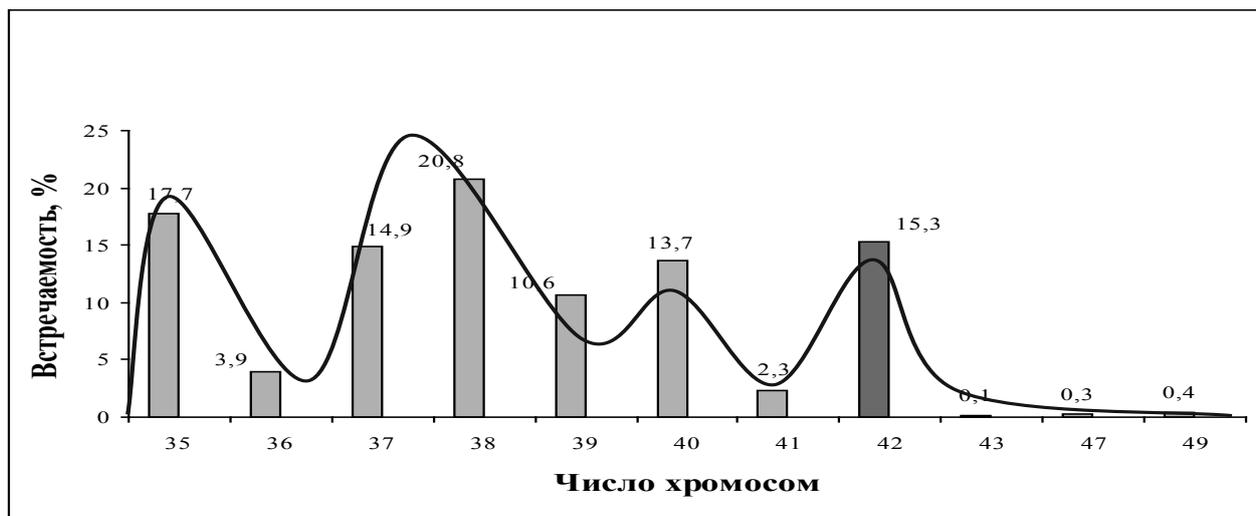


Рис. 7. Диаграмма распределения функциональных гамет ржано-тритикальных гибридов F_1 по числу хромосом и интегральная кривая значений “модели цитологических механизмов гаметогебеза” у пентаплоидов RRABR, $5x=35$.

Проведенный анализ генотипической специфичности и цитологических механизмов мейоза позволил установить следующие основные цитогенетические факторы микроспорогенеза у ржано-тритикальных гибридов F_1 , способствующие формированию у них гамет различного качественного и количественного хромосомного состава:

- Специфичность геномного состава ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$) и степень гомологии хромосом (наличие гомо- и гомеологичных геномов исходных видов). Диплоидный базовый RR-геном, его нормальное мейотическое деление и, как следствие, присутствие полного гаплоидного набора R-хромосом в гаметах – фактор нормализации мейоза и функциональности (жизнеспособности и фертильности) гамет различного хромосомного состава, частичной мейотической нередукции.

- Генотипическая специфичность, паритетная экспрессия и совместный генетический контроль ключевых этапов мейоза системами ржи и пшеницы в конкурентном взаимодействии и под влиянием плазмогенов ржи.

- Особенности сегрегации (деления, распределения) и элиминации хромосом исходных геномов, обусловленные различными типами полярной ориентации их центромер в связи со специфичностью спаривания и синапсиса в профазе мейоза. Относительно высокий

уровень частичной мейотической нередукции гамет (~15%).

С учетом перечисленных цитогенетических факторов показано, что формирование функциональных гамет с различным количеством и геномным составом хромосом у ржано-тритикальных гибридов F_1 является источником генетического разнообразия секалотритикум. Специфичность гаметогебеза у пентаплоидов F_1 обусловлена уникальным геномным составом и генотипическими особенностями взаимодействия генетических систем контроля мейоза исходных видов. Установлено, что ржаной RR-геном в процессе формирования и стабилизации полигенома секалотритикум выступает в качестве базового (буферного), что значительно расширяет их генетическую изменчивость и возможности хромосомной реконструкции. Показано, что однократный беккросс гибридов F_1 на тритикале является эффективным способом преодоления их стерильности и достижения амфидиплоидного уровня и способствует сохранению у секалотритикум гетерогенности R-геномов различного происхождения. Таким образом, ржано-тритикальные пентаплоидные гибриды F_1 (RRABR, $5x=35$) и полученные на их основе ржано-пшеничные амфиплоиды являются ценным исходным материалом для хромосомной реконструкции секалотритикум и рекомбинационной селекции тритикале [5, 20, 21].

Список использованных источников

1. Census of Aquaculture // United States Summary and State Data – USDA, National Agricultural Statistics Service – Geographic Area Series. – from www.usda.gov/nass
2. Гордей, И.А. Создание ржано-пшеничных амфидиплоидов (секалотритикум) / И.А. Гордей, Г.М. Гордей, Л.В. Новикова // Генетика. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 783-787.
3. Гордей, И.А. Особенности скрещиваемости ди- и тетраплоидной ржи с гексаплоидными тритикале / И.А. Гордей [и др.] // Весці НАН Беларусі, сер. біял. навук. – 1999. – № 2. – С. 39-42.
4. Люсиков, О.М.. Создание ржанопшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум (RRAABB, 2n=42): особенности мейоза у ржано-тритикальных гибридов F1 (RRABR, 5x=35) / О.М. Люсиков [и др.] // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 7. – С. 902-909.
5. Генетические основы селекции растений. В 4 т. / науч. ред. А.В.Кильчевский, Л.В.Хотылева – Минск: Белорус. наука, 2008. – Т. 1. Общая генетика растений. – 551 с.
6. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева – Москва: Агропромиздат, 1988. – 380 с.
7. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 320 с.
8. Sybenga, J. What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and an hypothesis / J. Sybenga // Chromosoma. – 1999. – Vol. 108, № 4. – P. 209-219.
9. Hauf, S. Kinetochore Orientation in Mitosis and Meiosis / S. Hauf, Y. Watanabe // Cell. – 2004. – Vol. 119, № 3. – P. 317-327.
10. Tanaka, T. U. Bi-orienting chromosomes: acrobatics on the mitotic spindle / T. U. Tanaka // Chromosoma. – 2008. – Vol. 117, № 6. – P. 521-533.
11. Jelluma, N. Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment / N. Jelluma [et al.] // Cell. – 2008. – Vol. 132, № 2. – P. 233-246.
12. O'Connell, C. B. The spindle assembly checkpoint is satisfied in the absence of interkinetochore tension during mitosis with unreplicated genomes / C. B. O'Connell [et al.] // The Journal of Cell Biology. – 2008. – Vol. 183, № 1. – P. 29-36.
13. Azimzadeh, J. Structure and duplication of the centrosome / Azimzadeh J, Bornens M. // Journal of Cell Science. – 2007. – Vol. 120, № 13. – P. 2139-2142.
14. Mikhailova, E. I. The effect of the wheat Ph1 locus on chromatin organization and meiotic chromosome pairing analyzed by genome painting / E. I. Mikhailova [et al.] // Chromosoma. – 1998. – Vol. 107, № 5. – P. 339-350.
15. Vega, J. M. Effect of the Pairing Gene Ph1 on centromere misdivision in common wheat / J. M. Vega, M. Feldman // Genetics. – 1998. – Vol. 148, № 3 – P. 1285-1294.
16. Соснихина, С. П. Генетический контроль синапсиса хромосом в мейозе у ржи *Secale cereale* L.: ген *syl9*, вызывающий гетерологичный синапсис / С. П. Соснихина [и др.] // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 81-90.
17. Щапова, А. И. Генетическая обусловленность нерасхождения хромосом в мейозе пшенично-ржаных полигаплоидов / А. И. Щапова, Т. А. Потапова, Л. А. Кравцова // Генетика. – 1987. – Т. 23, № 3. – С. 473-481.
18. Щапова, А. И. Роль хромосом ржи в генетическом контроле эквационного деления унивалентов у пшенично-ржаных димносомиков / А. И. Щапова [и др.] // Генетика. – 1998. – Т. 34, № 8. – С. 1168-1170.
19. Kitamura, E. Kinetochore-microtubule interaction during S phase in *Saccharomyces cerevisiae* / E. Kitamura [et al.] // Genes Dev. – 2007. – Vol. 21, № 24. – P. 3319-3330.
20. Гордей, И.А. Способ получения ржано-пшеничной хромосомно-замещенной формы секалотритикум / И.А. Гордей [и др.] // Патент на изобретение № 11442 (BY). – 2008.
21. Люсиков, О.М. Хромосомная реконструкция генома ржано-пшеничных амфидиплоидов секалотритикум (*×Secalotriticum*) / О.М. Люсиков, И.А. Гордей // Факторы экспериментальной эволюции организмов.: Сб. н. тр. IV Международной научн. конференции. – Автономная Республика Крым, Алушта, 22-26 сентября 2008 г. – Киев: Логос, 2008. – Т. 4. – С. 111-117.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ САМОФЕРТИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ РЖИ В СЕЛЕКЦИИ НА ГЕТЕРОЗИС

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Исследования, связанные с использованием эффекта гетерозиса, проводятся практически у всех культур. Причём, более высокий гетерозисный эффект дают перекрестноопыляющиеся культуры. Чаще всего гетерозис проявляется по нескольким признакам, в той или иной мере определяющим жизнеспособность растения. С точки зрения практического использования эффекта гетерозиса, рожь занимает в настоящее время лидирующее положение среди злаков. При создании гетерозисных гибридов показано, что одни и те же родительские формы при скрещиваниях в различных комбинациях способны давать разное по продуктивности гибридное потомство [1-3]. Поэтому в селекции гетерозисных гибридов основное место занимает подбор исходных генотипов для скрещивания и оценка комбинационной способности как общей (ОКС) так и специфической (СКС). Известно, что общая комбинационная способность определяется в основном аддитивными эффектами генов и той частью эпистатического эффекта, которая обусловлена взаимодействием генов аддитивного действия. Специфическая комбинационная способность обусловлена преимущественно неаддитивным действием генов – доминированием и эпистазом [4,5].

В настоящее время создание гетерозисных гибридов F_1 озимой диплоидной ржи основано на использовании в качестве родительских компонентов самофертильных линий. Попытки создания инцухт-линий путем принудительного самоопыления популяционных сортов ржи не привело к желаемым результатам из-за самонесовместимости ржи и сильной инбредной депрессии. Преодолеть данные барьеры удалось путем использования источников са-

мофертильности, найденных в ряде популяций ржи. В настоящее время уже локализован ряд мутаций самофертильности: $Sf_1(1R)$; $Sf_2(2R)$; $Sf_3(4R)$; $Sf_5(5R)$; $Sf_4(6R)$ [6]. Картированы 3 мутации, определяющие самофертильность в локусах S, Z и S5 самонесовместимости на хромосомах 1R; 2R и 5R соответственно. Определены 1 белковый и 3 ДНК-маркера для этих локусов [7,8]. На основе таких источников в настоящее время создаются коллекции селекционно-ценных линий с высоким уровнем самосовместимости и слабым проявлением инбредной депрессии.

Современные методы основаны на введении генов самофертильности в популяционные сорта. Несмотря на эффективность данного метода, процесс кастрации, гибридизации и отбор селекционно-ценных генотипов относительно трудоемок. Кроме того, как показывает практика, после последующего отбора инцухт-линий по морфологическим, хозяйственно-полезным признакам, комбинационной способности, уровню инбредной депрессии, закреплению стерильности и восстановлению фертильности, только 3-5% генотипов могут быть использованы в качестве родительских компонентов гетерозисных гибридов F_1 [9].

Новым подходом к повышению эффективности создания инцухт-линий как родительских компонентов гетерозисных гибридов F_1 является использование генетических систем ЦМС, устраняющие необходимость ручной кастрации [10,11]. Использование цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) даёт возможность проведения контролируемых скрещиваний у ржи. ЦМС обусловлена специфической мутацией плазмогенов и наследу-

ется по материнской линии. Восстановление фертильности осуществляется при взаимодействии такой цитоплазмы (цит-*s*) с ядерными генами (*Rf*) восстановления фертильности [12,13]. Типы ЦМС Р и G, открытые в свое время Гейгером (Р-тип, 1970), Адольфом и Винклером (G-тип, 1985), различаются между собой по генетическому контролю [14]. Установлено, что G-ЦМС контролируется митохондриальным геномом и одним основным ядерным ms_1 (*gf*) геном, локализованным на хромосоме 4RL; также описаны гены-модификаторы на хромосомах 3R (ms_2) и 6R (ms_3). Р-ЦМС имеет более сложный контроль, который до конца не изучен. По одним данным этот тип контролируется «стерильной» цитоплазмой и двумя ядерными генами. Другие исследователи утверждают, что *ms* генов не два, а четыре [15]. Согласно результатам исследований с использованием технологии ПДРФ, Р-ЦМС контролируется двумя основными ядерными *ms* генами, локализованными на хромосомах 1R и 4R,

а также тремя *ms* генами с меньшим эффектом, локализованными на хромосомах 3R, 5R и 6R [16]. Однако, до конца не выяснено, доминантными либо рецессивными генами контролируется Р-ЦМС. Результаты исследований Гейгера показали, что в закреплении стерильности участвуют рецессивные гены, доминантные восстанавливают фертильность пыльцы. В одной из последних публикаций Мельца [13] отмечено, что закрепление стерильности контролируется доминантными генами. В настоящее время недостаточно изучен генетический контроль используемых систем ЦМС. Не достаточно изучены также особенности взаимодействия генетических систем ЦМС и самофертильности. Исследования, направленные на изучение механизмов взаимодействия систем ЦМС (*S/msms*) и самофертильности (*Sf, Zf*), а также изучение особенностей генетического контроля различных типов ЦМС (Р- и G-типов) позволят повысить эффективность создания гетерозисных гибридов F_1 озимой ржи.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали самостерильный сорт озимой ржи Калинка, самофертильные линии (I_6-I_{16}), включающие высоко- и среднестебельные линии, линии с доминантным контролем короткостебельности. Объектами исследований являлись межлинейные и сортолинейные реципрокные гибриды F_1 и F_2 , а также гибриды F_1 озимой диплоидной ржи с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) Р- и G-типов. Исследование и идентификацию исследуемых форм ржи проводили методом электрофоретического анализа белков эндосперма семян, разработанным в отделе молекулярной биологии ВИР [17], в нашей модификации, и стандартным ар-

битражным методом, включенным в Международные правила анализа семян. Хромосомный анализ исследуемого материала проводили путем дифференциального окрашивания хромосом по методике, разработанной в Институте молекулярной биологии РАН [18]. Основным методом создания и изучения новых линий и гибридов F_1 являлась парная изоляция и топкросс МС-тестеров и самофертильных линий. В полевых условиях растения выращивали мелкоделяночным способом на опытной базе Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. Разработана принципиальная схема создания гетерозисных гибридов F_1 озимой диплоидной ржи (рис. 1).

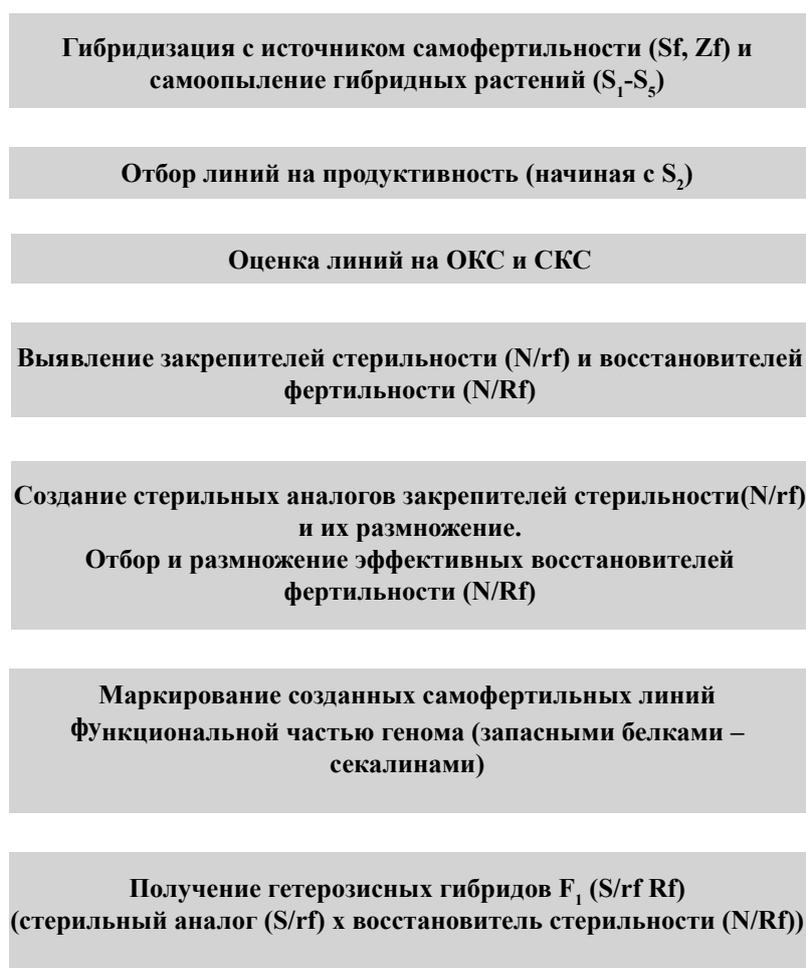


Рис. 1. Схема создания нового генофонда исходного материала гибридной ржи.

Результаты и обсуждение

На первых этапах создания самофертильных линий (I_1 - I_2) необходим отбор высокофертильных, нерасщепляющихся по селективируемым признакам форм (таблица 1).

Таблица 1

Характеристика количественных признаков самофертильных линий озимой ржи

Линии	Высота растений, см			Кустистость			Масса зерна, г.								Продуктивность, г/м ²				
	1000 зерен			Колоса			Растения			2003			2004			Среднее			
	2003	2004	Среднее	2003	2004	Среднее	2003	2004	Среднее	2003	2004	Среднее	2003	2004	Среднее	2003	2004	Среднее	
год																			
37-10	95,0	120,0	102,3±0,47	6,5	6,00	9,1±0,22	19,5	21,5	23,2±1,04	0,4	0,5	0,4±0,02	2,5	2,8	2,2±0,17	18,1	77,1	47,6±0,21	
51-16	107,0	133,8	73,5±1,21	5,0	6,25	5,2±0,29	23,7	21,6	22,8±1,08	0,8	0,4	0,9±0,14	3,8	2,6	4,7±0,86	18,9	32,9	25,9±2,32	
51-31	127,5	141,7	102,1±0,74	8,0	7,00	9,8±0,44	24,7	19,0	19,1±0,80	0,6	0,2	0,3±0,03	4,4	1,2	2,6±0,49	22,1	38,4	30,3±0,80	
12	113,8	132,5	112,1±0,47	5,8	5,00	4,3±0,15	14,0	32,0	23,2±0,98	0,2	0,7	0,3±0,02	0,8	3,6	1,4±0,17	6,6	54,6	30,6±0,13	
23	72,2	70,0	74,9±1,28	8,2	7,00	6,1±0,19	20,9	27,5	26,5±0,92	0,5	0,3	0,5±0,05	3,9	2,2	3,5±0,40	58,7	102,1	80,4±0,92	
26	137,0	133,0	107,1±1,33	4,7	4,53	9,1±0,39	26,7	29,4	27,6±0,78	0,9	0,8	0,4±0,02	4,2	3,8	2,8±0,18	21,0	89,4	55,2±0,43	
Стандарт Калинка	115,2	152,6	148,5±1,40	4,7	4,00	4,2±0,29	39,6	36,6	38,1±1,04	2,5	1,9	2,1±0,08	10,11	7,4	11,5±1,15	397,9	370,0	384,0±3,82	

Исследуемые линии различались между собой по признакам морфоструктуры растений и некоторым количественным признакам, что согласуется с ранее полученными данными [19]. Высота растений самофертильных линий зависела от генотипа и условий года. У большинства линий кустистость в 1-2 раза превышала популяционный сорт Калинку. Масса 1000 зерен варьировала в пределах от 14г(л12) до 32г(л12, л26). Масса зерна с колоса самая высокая была

у л26 независимо от года исследования. В отдельные годы у некоторых линий была снижена урожайность из-за низкой перезимовки растений и поражения снежной плесенью. Показано, что по признакам зерновой продуктивности ни одна из исследуемых линий не превышала сорт за все годы исследований. Анализ данных показал достоверное влияние условий года выращивания на изменчивость исследуемых признаков самофертильных линий (таблица 2).

Таблица 2

Результаты дисперсионного анализа влияния условий года выращивания на признаки растений самофертильных линий озимой ржи

Признаки		F _φ
Высота		2,39
Кустистость		5,68**
Масса зерна	1000 зерен	3,29*
	Колоса	4,98**
	Растения	1,46
Продуктивность		3,86**

Примечание:

Различия достоверны * - при P=0,05;

** - при P= 0,01

Выявлены достоверные отличия по кустистости, массе 1000 зерен, массе зерна с колоса и зерновой продуктивности у самофертильных линий озимой ржи. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей о влиянии условий года выращивания на признаки морфоструктуры и зерновой продуктивности [1, 4].

В последнее десятилетие результаты генетического анализа у ржи, определения попарного сцепления генов, все больше основываются на изучении качественного состава различных ферментных систем; расположения генов, контролирующих изоферменты, в определенных хромосомах; выявлении совместного наследования этих генов. Информация о локализации и сцеплении генов у ржи обобщена в работах Мельца и Шлегеля [6]. Для отнесения группы сцепления к определенной хромосоме можно использовать цитологические маркеры хромосом - гетерохроматиновые блоки, выявляемые окрашиванием хромосом по Гимза. Такие работы, в которых показано сцепление генных локусов с С-блоками, известны, в частности,

для ячменя, пшеницы и ржи [20-23]. Возможность использования гетерохроматиновых блоков хромосом ржи в качестве цитологических маркеров в генетическом анализе ржи и тритикале требует изучения наследования маркерных С-блоков и оценки уровня их рекомбинагенеза в кариотипе исходных форм ржи.

В процессе изучения расположения гетерохроматиновых участков и их величины в кариотипе ржи показана высокая изменчивость хромосом на популяционном уровне. Поэтому наибольший интерес в генетических исследованиях ржи и пшенично-ржаных амфидиплоидов с использованием цитологических гетерохроматиновых маркеров представляют различающиеся по рисунку дифференциальной окраски хромосом гомозиготные, инбредные линии ржи, у которых отмечается стабильное наследование С-блоков в потомстве. Выделены инбредные линии озимой ржи из генетической коллекции ИГЦ, характеризующиеся маркерными гетерохроматиновыми блоками на 1R, 4R, 6R и 2R/7R хромосомах. Линии 51-16 и 51-31, отличались от стандарта

мелким блоком гетерохроматина в спутнике ядрышкообразующей 1R-хромосомы и мелким С-блоком на теломере короткого плеча хромосомы 6R. Линия 37-10, имела в спутнике хромосомы 1R блок средних размеров и увеличенный блок на теломере длинного плеча хромосомы 2R/7R. Линия 26, отличалась на-

личием мелкого блока теломерного гетерохроматина в коротком плече хромосомы 4R. Поскольку изучаемые линии имели различия по дифференциальной окраске хромосом, был проведен электрофоретический анализ секалина для оценки функциональной активности хромосом генома ржи (таблица 3).

Таблица 3

Белковые формулы суммарных спектров запасных белков секалинов сортов-анализаторов и маркированных инбредных линий озимой ржи

NN	Маркерная хромосома	Белковая формула			
		α	β	γ	ω
Пшеница Зарница (N54029 кат. ВИР)		5 6 7	2 3 4 5	$\bar{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$	$\bar{2}$ 4 6 7 $\bar{8}$ 9
Рожь Ильмень			$\underline{3}$ $\underline{4}$ $\underline{5}$	1 5	$\bar{1}$ $\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ $\bar{7}$ 8 10 $\bar{11}$
л12			$\bar{3}$ $\underline{4}$ $\underline{5}$	4	$\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ 7 8 10 $\bar{12}$
л23			$\bar{3}$ $\underline{4}$ $\underline{5}$	1 4	$\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ 7 8 10 $\bar{12}$
л26	4R		3 4 5	$\bar{1}$ $\underline{5}$	$\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ 8 10
л37-10	2R/7R		$\bar{3}$ $\underline{4}$ $\underline{5}$	$\underline{5}$	$\bar{1}$ $\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ 8 10
л51-16	1R, 6R		$\underline{3}$ $\underline{4}$ $\underline{5}$	1 $\bar{4}$ $\bar{5}$	$\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ $\underline{5}$ $\bar{7}$ 8 10
л51-31	1R, 6R		$\underline{3}$ $\underline{4}$ $\underline{5}$	$\bar{4}$ $\bar{5}$	$\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ $\bar{5}$ $\bar{6}$ $\bar{7}$ 8 $\bar{10}$
л168			2 3 $\bar{4}$ $\bar{5}$	$\bar{3}$ $\bar{4}$ $\underline{5}$	$\underline{2}$ $\underline{3}$ $\underline{4}$ $\bar{8}$ 10 $\bar{11}$

На электрофореграммах всех исследуемых форм озимой ржи хорошо идентифицируются три фракции, характерные для проламинов ржи – β , γ , и ω с четким расположением компонентов в пределах каждой фракции. Позерновой анализ секалина показал что, исследуемые самофертильные линии являлись низкополимерными. Изменчивость спектра секалина связана в основном с компонентами β и γ зон В ω зоне четко представлены компоненты ω 234, ω 234 γ 5, кодируемых транслоцированным локусом хромосомы 1R. Исследуемые линии отличались по составу и степени выраженности компонентов, кодируемых локусом *Sec1*, что связано с различным их генетическим происхождением. Для линий л-23 и л-51-16 показано наличие компонента ω 5. Выявлены слабоподвижные компоненты в ω -зоне (10-13), кон-

тролируемые хромосомой 2R. У всех линий присутствовали компоненты β 45 различной интенсивности. Наиболее полно γ зона представлена у л168, у остальных линий выявлены отдельные компоненты этой зоны. Электрофоретические спектры секалина инбредных линий озимой ржи выявили стабильность генотипов в ряду поколений. Исследуемые формы идентифицированы по наличию определенных типов спектра, частоте их встречаемости и особенности экспрессии запасных белков семян в геноме ржи. Электрофорез секалинов является достаточно надежным методом для идентификации геномов и позволяет отбирать перспективные формы для создания новых самофертильных линий озимой ржи.

Проведены межлинейные, сортолинейные скрещивания с использованием доноров ЦМС

и отбор самофертильных линий с высокой комбинационной способностью (СКС и ОКС). Известно, что неодинаковая реакция разных генотипов на внешние факторы обусловлена изменением действия генов количественных признаков [24]. Сравнительный анализ реципрокных гибридов F_1 и F_2 , полученных с использованием самофертильных линий озимой ржи и популяционного сорта Калинка, позволил выявить генотипические и реципрокные различия гибридных форм по некоторым признакам зерновой продуктивности растений (таблица 4). Результаты наших исследований показывают, что по массе 1000 зерен гибриды F_1 и F_2 не превышали сорт-стандарт Калинку. Выявлены межлинейные и сортолинейные гибриды F_1 (♀, ♂ л51-16), которые по массе зерна с колоса превышали стандарт в 1,3-1,7раза. Выделено 7 гибридов F_1 с участием самофертильных линий (♀, ♂ 51-16, 51-31, 12, 23, 26), превышающих сорт Калинку по признаку массы зерна с растения. Однако по зерновой продуктивности только межлинейные гибриды F_1 с участием линий (♀ л12, л23), превышали

стандарт. Все сортолинейные гибриды F_1 , с участием самофертильных линий как отцовского компонента по массе зерна с растения и зерновой продуктивности превышали стандарт Калинку в 1,3-2 раза. Полученные данные указывают, что у сортолинейных гибридов F_1 проявляется экспрессия генов самофертильности. Для гибридов F_2 характерно снижение значений по всем исследуемым показателям зерновой продуктивности, что согласуется со многими исследованиями [4,10]. Отдельные гибриды могут использоваться для получения новых самофертильных линий с высокой комбинационной способностью.

Для повышения эффективности практической селекции гибридной ржи актуальной проблемой является подбор родительских компонентов по восстанавливающей и закрепляющей способности и по степени их генетической дивергентности. Не установлено, какое генетическое расстояние приводит к наибольшему уровню гетерозиса, и испытание по потомству остается единственным надежным методом подбора родителей гибридов.

Таблица 4

Характеристика признаков продуктивности растений гибридов F_1 и F_2 озимой ржи

Комбинации скрещивания	Кол-во растений, шт	Масса зерна, г.			Продуктивность, г/м ²
		1000 зерен	колоса	растения	
Гибриды F_1					
37-10 X СФ-линия	24	35,74	0,84	6,71	335,38
СФ-линия X 37-10	21	34,72	0,90	7,34	135,59
37-10 x Калинка	24	35,51	1,11	7,76	329,63
51-16 X СФ-линия	32	30,56	1,10	6,60	132,00
СФ-линия X 51-16	24	40,38	2,10	13,60	272,00
51-16 x Калинка	23	26,00	2,60	15,60	312,00
51-31 X СФ-линия	25	27,27	0,90	6,54	161,82
СФ-линия X 51-31	32	33,36	1,08	10,65	297,89
51-31 x Калинка	28	28,20	1,06	10,36	352,58
12 X СФ-линия	29	34,14	1,21	9,64	457,90
СФ-линия X 12	25	39,22	1,01	5,80	146,25
12 X Калинка	38	39,54	0,71	5,70	258,58
23 X СФ-линия	22	39,07	0,88	10,53	526,36
СФ-линия X 23	35	31,92	0,95	7,77	330,87
23 X Калинка	25	26,11	0,75	5,60	196,40
26 X СФ-линия	24	34,20	1,10	9,62	286,49
СФ-линия X 26	22	35,74	0,84	6,71	335,38

Продолжение таблицы 4

26 X Калинка	20	19,57	0,56	3,43	72,98
Калинка X СФ-линии	104	40,56	1,51	12,33	892,23
Гибриды F₂					
37-10 X СФ-линия	132	31,00	0,88	5,74	249,38
СФ-линия X 37-10	120	34,30	0,71	4,23	172,83
51-16 X СФ-линия	84	28,50	0,99	5,45	329,63
СФ-линия X 51-16	102	30,00	1,01	6,55	352,50
51-31 X СФ-линия	96	23,40	0,69	5,64	206,53
СФ-линия X 51-31	104	25,75	0,90	5,79	176,00
12 X СФ-линия	108	30,00	0,74	5,90	278,50
СФ-линия X 12	92	27,00	0,66	4,63	266,25
23 X СФ-линия	124	26,10	0,66	4,64	291,98
СФ-линия X 23	104	25,61	0,57	3,87	190,29
26 X СФ-линия	130	30,27	0,90	5,55	255,15
СФ-линия X 26	100	29,10	0,97	6,68	307,57
Стандарт-Калинка		42,65	1,58	9,47	445,00

Гибридизация с источником ЦМС новых линий, приводит к гетерозису в отношении большинства количественных признаков. Это позволяет выделять высокопродуктивные гибриды, а также доноры закрепителей стерильности (S/rf) и восстановителей фертильности (N/Rf). Как показали результаты наших исследований, создание гетерозисных гибридов F₁ с использованием как ЦМС Р- и G-типа, так и современных популяционных сортов, в отдельных комбинациях позволяет достичь высокого уровня восстановления фертильности пыльцы и эффекта гетерозиса по зерновой продуктивности. Изучен уровень фертильности пыльцы у гибридов Р- и G-типов от скрещиваний МС-тестер x инцухт-линия. Для создания гибридов на основе ЦМС G-типа

из коллекции новых самофертильных линий озимой ржи выделен один генотип с полным (100%) и один с частичным (80%) закреплением стерильности. Выявлено 12 линий восстановителей фертильности (от 58% до 97%) для гибридов на основе ЦМС Р-типа. Показано, что фертильность пыльцы у гибридов F₁ зависит как от отцовского, так и от материнского компонентов скрещивания. При однократном скрещивании ЦМС-форм Р- и G-типа с самофертильными линиями не выявлено гибридов, превышающих стандарт по анализируемым признакам (таблица 5). Однако выделены гибриды с использованием ЦМС G-типа (♀) и самофертильной линии 26 (♂), которые превышали стандарт по зерновой продуктивности на 11-39%.

Таблица 5

Продуктивность гибридов F₁ озимой ржи

Комбинации скрещивания	Масса зерна, г.			Продуктивность, г/м ²	Уровень гетерозиса, %
	1000 зерен	колоса	растения		
ЦМС Р-тип X СФ-линия					
X 37-10	31,60	1,18	8,83	256,28	
X 51-16	32,00	1,38	3,41	281,65	
X 12	19,00	0,68	5,46	155,25	
X 23	23,21	0,73	4,77	231,27	
X 26	33,60	2,02	2,30	218,93	
ЦМС G-тип X СФ-линия					
X 51-16	29,20	0,77	6,80	442,23	11

Продолжение таблицы 5

X 12	30,00	1,27	6,37	171,88	
X 23	25,00	1,25	3,96	227,60	
X 26	36,00	0,66	8,47	550,30	39
Стандарт - Калинка	39,60	2,53	10,11	397,90	
ЦМС Р-тип X СФ-линия					
МС х л37-10					
двойной межлинейный гибрид	35,65	1,01	9,14	274,02	
двойной линейнопопуляционный гибрид	37,35	1,73	12,10	519,16	40
простой гибрид МС х СФ	31,15	0,94	6,86	289,53	
МС х л23					
двойной межлинейный гибрид	35,76	1,00	8,06	369,00	
двойной линейнопопуляционный гибрид	41,39	1,95	15,71	713,08	93
простой гибрид МС х СФ	41,50	2,30	13,82	581,70	57
МС х л12					
двойной межлинейный гибрид	40,00	1,45	8,70	637,78	72
двойной линейнопопуляционный гибрид	31,50	1,05	8,38	368,53	
МС х л26					
двойной линейнопопуляционный гибрид	44,50	2,30	18,40	657,85	78
простой гибрид МС х СФ	43,00	2,14	17,12	545,70	48
МС х л51-16					
двойной линейнопопуляционный гибрид	38,00	2,17	17,39	541,19	46
простой гибрид МС х СФ	40,10	2,10	12,60	535,40	44
ЦМС G-тип X СФ-линия					
МС х л51-16					
простой гибрид МС х СФ	32,00	1,52	9,11	588,65	59
МС х л12					
двойной межлинейный гибрид	38,20	1,58	9,46	393,98	7
двойной линейнопопуляционный гибрид	39,20	1,78	10,65	477,63	29
простой гибрид МС х СФ	39,80	1,90	11,41	477,73	29
МС х л23					
двойной межлинейный гибрид	41,80	0,82	4,94	330,91	
двойной линейнопопуляционный гибрид	39,20	1,34	8,04	443,33	20
простой гибрид МС х СФ	38,35	1,35	10,31	515,71	39
МС х л26					
простой гибрид МС х СФ	35,20	1,62	11,34	546,6	48
Стандарт Калинка	36,61	1,85	7,40	370,0	

Получены двойные межлинейные и линейнопопуляционные гибриды на основе ЦМС-форм Р- и G-типа, превышающие стандарт по многим изучаемым признакам. Известно, что различие Р- и G-типов ЦМС ржи обусловлено различиями в структурных перестройках митохондриального генома, следствием которых и является возникновение того или иного типа

стерильной цитоплазмы, а также разной локализацией ядерных генов-восстановителей фертильности [16]. Одним из основных барьеров при работе с ЦМС Р-типа является восстановление фертильности гибридов F_1 . Используемые в настоящее время линии восстановители фертильности имеют относительно низкий индекс восстановления, поэтому гибриды F_1

более восприимчивы к спорынье [10]. Результаты наших исследований подтверждают эффективность метода получения гетерозисных гибридов на основе ЦМС Р-типа с использованием популяционных сортов. Исследуемые двойные линейнопопуляционные гибриды с участием самофертильных линий (σ^3 37-10, 23, 26, 51-16) превосходили стандарт по всем анализируемым признакам зерновой продуктивности. Уровень конкурсного гетерозиса составлял в отдельных комбинациях 40 – 93%. Известно, что для гибридов на основе ЦМС G-типа характерна низкая частота генов закрепления стерильности [13]. Результаты наших исследований показали, что наиболее высокий эффект гетерозиса по признакам продуктивно-

сти растений проявлялся у простых межлинейных гибридов с использованием ЦМС G-типа и самофертильных линий. Уровень конкурсного гетерозиса составлял 7 – 59%, и зависел от характера взаимодействия отцовского и материнского компонента скрещивания.

Для установления достоверности различий между различными типами скрещиваний был проведен дисперсионный анализ. Между гибридами F_1 на основе ЦМС Р- и ЦМС G-типов выявлены достоверные различия по всем изучаемым признакам продуктивности растений.

На основании полученных данных можно заключить, что эффект гетерозиса у гибридов зависит от компонентов гибридизации, зерновой продуктивности.

Заключение

В результате исследований созданы и выделены маркированные самофертильные линии, обеспечивающие гетерозисный эффект при скрещивании как с популяционными сортами, так и с линиями ЦМС Р- и G-типов. Самофертильные линии 12, 23, 26, 51-16 следует использовать в качестве отцовских компонентов при создании гетерозисных гибридов F_1 .

Создание гетерозисных гибридов F_1 с использованием ЦМС Р- и G-типов, и современных популяционных сортов позволяет достичь высокого уровня восстановления

фертильности пыльцы и эффекта гетерозиса по зерновой продуктивности.

Положительный эффект истинного гетерозиса изучаемых гибридов обусловлен, по нашему мнению, накоплением компенсационного комплекса генов (ККГ) у линий на фоне ЦМС-мутаций. Эффект гетерозиса у гибридов зависит от степени совместимости компонентов гибридизации и от их зерновой продуктивности.

Экспериментально обоснована перспективность использования самофертильных линий в гетерозисной селекции озимой ржи.

Список использованных источников

1. Кильчевский, А.В. Гетерозис в селекции сельскохозяйственных растений / Кильчевский А.В., Хотылева Л.В., Тарутина Л.А., Шаптуренко М.Н. // Молекулярная и прикладная генетика. – 2008. – Т.8 – С.7-24.

2. Шимко, В.Е. Взаимосвязь структурно-функциональных особенностей фотосинтетического аппарата и продуктивности гибридов F_2 озимой ржи (*Secale cereale* L.) / В.Е. Шимко, И.В. Кульминская, Л.Н. Калитуха, И.А. Гордей // Физиология растений. – 2009. – Т.56, №1. – С.139-146.

3. Струнников, В.А. Новая гипотеза гетерозиса: ее научное и практическое значение/ В.А. Струнников // вестник с.-х. науки. – 1983. – №1. – С.34-40.

4. Теоретические основы селекции зер-

новых культур на продуктивность / Л.В. Хотылева [и др.]; под общ. ред. Д.Ф. Санько. – Минск: Наука и техника. – 1987. – 279 с.

5. Селекция растений: новые генетические подходы и решения / отв.ред. Н.Н. Балашова. – Кишинев: Штиинца. – 1991. – 341 с.

6. Schlegel, R. Genes, marker and linkage data of rye (*Secale cereale* L.): 5th updated inventory / R. Schlegel, G. Melz, V. Korzun // Euphytica. – 1998. – N101. – P. 23-67.

7. Gonzales, G. Genetic mapping between Gli-B1 locus and a telomeric C-heterochromatin band in wheat / G. Gonzales, E. Hueros, E. Gomez, J.C. Sanz // Theor. Appl. Genet. – 1990. – Vol. 89. – P. 791-794.

8. Егорова, И.А. Анализ сцепления биохимических и морфологических маркеров

1R-, 2R-, и 5R-хромосом ржи с мутациями автофертильности в основных локусах несовместимости / И.А. Егорова, Т.И. Пенева, О.А. Баранова, А.В. Войлоков // Генетика. – 2000. – Т. 36. – № 12. – С. 1688-1696.

9. Гордей, С.И. Эффект генов самофертильности (Sf) при создании инцухт-линий озимой диплоидной ржи (*Secale cereale* L.) / С.И. Гордей, В.Е. Шимко, И.А. Гордей, Д.Ю. Артюх. // Весці НАН Б, сер. біял. навук. – 2006, – №1. – С. 46-49.

10. Geiger, H.H. Hybrid rye and Heterosis. / H.H. Geiger; T. Miedaner // In: Coors, J.G. and S. Pandey (eds.). Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. Hrsrg. Madison, Wisconsin, USA.: Crop Sci. Soc. America – 1999. – P. 439-450.

11. Иванов, М. К., Цитоплазматическая мужская стерильность и восстановление фертильности пыльцы у высших растений / М. К. Иванов, Г. М. Дымшиц // Генетика. – 2007. – Т. 43. – № 4. – С. 451-468.

12. Rafalski, A. The genetic diversity of components of rye hybrids. / A.Rafalski, L.Madej, I.Wisnewska, M.Gawel. // Cellular & Molecular biology letters. – 2002. – Vol.7. – P. 471-475.

13. Melz Gi. Genetics of a male-sterile rye of “G-type” with results of the first F₁ hybrids./ Gi. Melz, Gu. Melz, F. Hartmann // In proc. Int. Symp. on rye breed. and gen. EUCARPIA. – 2001. – P. 43-50.

14. Steinborn, R. A new type of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.): analysis of mitochondrial DNA / R. Steinborn, W. Schwabe, A. Weihe, K. Adolf I, G. Melz, and T. Berner // Theor Appl Genet – 1993. – Vol. 85. – P. 822-824.

15. Madej, L. Ocena plodnosci mieszancow zyta. / L. Madej, R. Osinski, J. Jagodinski // Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimat. Roslin., Radzikow, Poland, – 1995. – No.195/196. – P. 283-290.

16. Melz, G. Beitrage zur Genetik des Rog-

gens (*Secale cereale* L.). // Diss B, AdL der DDR, Berlin. – 1988. – 173 p.

17. Пенева, Т.И. Анализ и регистрация сортов и линий ржи по секалину методом электрофореза (методические указания) / Т.И. Пенева, Н.М. Мартыненко, В.Г. Конарев. – Л. – 1989. – 52 с.

18. Бадаев, Н.С. Идентификация хромосом А и D геномов пшеницы с использованием замещений и перестроек между гомеологами у пшениц и тритикале / Н.С. Бадаев, Е.Д. Бадаева, Н.Л. Большева, А.В. Зеленин // Докл. АН СССР. – 1983. – Т. 273, – № 4. – С. 994-996.

19. Шимко, В.Е. Структурно-функциональные особенности фотосинтетического аппарата инбредных линий озимой ржи (*Secale cereale*, L.) в связи с продуктивностью. / В.Е. Шимко, И.В. Кульминская, Л.Н. Калитухо, И.А. Гордей, С.Н. Кабанова // Доклады НАН Беларуси. – 2004. – Т. 48, – №.1 – С. 72-76.

20. Linde-Laursen, J. Linkage map of the long arm of barley chromosome3 using C-bands and marker genes / J. Linde-Laursen // Heredity. – 1982. – V. 49. – P. 27-35.

21. Михайлова, Е.И. Использование гетерохроматиновых маркеров хромосом в генетическом анализе у ржи *Secale cereale* L. / Е.И. Михайлова, С.П. Соснихина, Г.В. Некрушева, Фам Тхынь Фыонг. // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 1. – С. 85-91.

22. Sybenga, J. Rye chromosome nomenclature and homoeology relationships / J. Sybenga // Z.Pflanzenzuchtg. – 1983. – N 90. – P. 297-304.

23. Sing, R.G. Evidence of heterochromatin polymorphism through crossingover / R.G. Sing // Wheat Inform. Serv. – 1977. – N 44. – P. 19-21.

24. Жученко, А.А. Экологическая генетика культурных растений / А.А. Жученко – Киншинева: Штиинца, – 1991. – 341 с.

А.Д. Политыко¹, О.М. Хурс¹, Т. Лир²

ГЕНОМНЫЕ БОЛЕЗНИ ЧЕЛОВЕКА. АНАЛИЗ ЛОКУСА 22q11

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66,

²Институт генетики человека и антропологии,
Университет им. Ф. Шиллера, Коллегиенгассэ 10, D-07743 г. Йена, ФРГ

Введение

В течение последнего десятилетия прогресс в медицинской цитогенетике связан с соединением двух методологических подходов – молекулярных методов изучения генетического дефекта с классическим методом анализа морфологии метафазных хромосом с помощью микроскопа. Так возникла молекулярная цитогенетика, основой которой явилась флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Молекулярная цитогенетика предоставляет значительный массив новых сведений о механизмах aberrаций хромосом человека. Благодаря этому в медицинской генетике в последнее время выделяются новые группы заболеваний, в основу общности которых положена не схожесть клинических симптомов, не закономерности течения болезней или другие общие клинические характеристики. Объединяющим базисом таких новых форм заболеваний становится основополагающий хромосомный и молеку-

лярный механизм их возникновения.

Геномные болезни – термин, предложенный в 1998 году [1] в качестве новой категории наследственных болезней. Он объединяет заболевания, которые возникают в определённых «горячих» точках хромосом, и размер хромосомного сегмента, вовлечённого в единый молекулярный механизм формирования дефекта, составляет несколько миллионов пар оснований (англ. megabase – Mb). Выделение этой группы заболеваний позволяет специалистам, изучающим и диагностирующим генетические болезни, под новым углом зрения рассматривать уже клинически хорошо известные синдромы и, что очень важно, теоретически предполагать наличие новых болезней. Данное исследование посвящено одной группе патологии – геномным болезням в хромосомном локусе 22q11.

Цель исследования – охарактеризовать геномные болезни в локусе 22q11 в Беларуси.

Материалы и методы

Исследуемую группу составили пациенты, направленные врачами педиатрами, неврологами, кардиологами на медико-генетическое консультирование в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» и в областные медико-генетические центры, а также дети, состоящие на учете в регистре врождённой патологии медико-генетической службы Беларуси.

Цитогенетическая диагностика. Препараты метафазных хромосом получены из ФГА-стимулированной культуры лимфоцитов периферической крови, культуры клеток амниоцитов, клеток ворсин хориона, а также

культур клеток абортированных по медицинским показаниям плодов *postmortem* согласно стандартным процедурам. Исследование выполнено с применением цитогенетического анализа GTG-окрашенных хромосом (550-800 сегментов в гаплоидном наборе). Генетический дефект при добавочной маркерной хромосоме был обнаружен при стандартном кариотипировании.

Молекулярно-цитогенетическая диагностика. Охарактеризовать материал, входящий в состав аномальной хромосомы или установить субмикроскопическую aberrацию кариотипа

возможно только с помощью молекулярно-цитогенетических подходов. FISH проводилась по стандартному протоколу на препаратах метафаз хромосом и на интерфазных клетках. Диагностика выполнена с применением флуоресцентных локус-специфических, центромера-специфических, цельнохромосомных, регион-специфических микродис-

секционных ДНК-проб. Используются технологии как **одноцветных**, так и специальные методы **многоцветных** FISH: M-FISH, cenM-FISH, subcenM-FISH [2]. Анализ хромосом осуществлялся с помощью флуоресцентного микроскопа DMLB (Leica), а также оптико-компьютерных систем CytoVision (Англия) и Metasystems, (Carl Zeiss, Германия).

Механизмы и спектр геномных болезней

Хорошо известно, что в части случаев аномалии кариотипа реализуются в хромосомные болезни. Несбалансированные перестройки хромосом, такие как интерстициальные или терминальные делеции, дупликации, деривативные хромосомы как результат транслокаций, инсерций, а также рекомбинантные хромосомы приводят в геном дисбаланс. Так, «доза» генов может нарушаться с определённой долей вероятности в потомстве носителей сбалансированных аномалий хромосом в результате прохождения закономерных мейотических процессов сегрегации хромосом в гаметогенезе. К дисбалансу дозы генов приводят и случаи аномального прохождения мейоза (запаздывание или нерасхождение гомологичных хромосом). Первоначально конституциональные и числовые нарушения у человека возникают спорадически в произвольных локусах генома, и каждая подобная аномалия является примером *de novo* мутации.

При геномных болезнях перестройки в структуре ДНК происходят в строго определённых точках генома. Частота таких aberrаций в популяции высока, что указывает на некую обусловленность повторяющихся «хромосомных ошибок», и из чего следует предполагать наличие некоего специфического механизма их формирования. Например, многочисленная клинически разнородная группа **синдромов микроделеций** представляет пример геномных болезней, характеризующихся локус-специфическими гемизиготными делециями. Причиной возникновения патологии является малая, не видимая в световой микроскоп при стандартном кариотипировании делеция, приводящая к гаплонедостаточности одного или чаще нескольких соседствующих генов, что дало этой группе второе название – **синдромы делеций сопредельных генов**. Утрата часто не связанных функционально генов, отвечающих за различные фенотипиче-

ские признаки, в конечном итоге формируют данный синдром. Микроделеции картированы в различных точках генома. Так, при синдроме Прадера-Вилли (OMIM#176270) происходит микроделеция в сегментах q11.2-q13 хромосомы 15, унаследованной от отца. Синдром Вильямса-Бойрена (OMIM #194050) характеризуется микроделецией в сегменте q11.23 хромосомы 7 – del(7)(q11.23q11.23). В этот перечень входят также синдромы Ангельмана (OMIM #105830), Смита-Маджениса (OMIM #182290), Миллера-Дикера (OMIM #247200), Рубинштейна-Тэйби (OMIM#180849), Ди Джорджи (OMIM #188400) и другие. Перечень синдромов микроделеций пополняется благодаря установлению микроделеционной природы у новых синдромальных форм: синдром моносомии 1p36 (OMIM#607872), синдром Сотоса (OMIM #117550), синдром наследственной невропатии со склонностью к параличам от сдавления (OMIM # 161500), нейрофиброматоз тип I (OMIM #162200).

Критическая область геномных болезней 22q11.2

Данный участок хромосомы 22 генома человека находится на длинном плече рядом с центромерой (рис. 1).

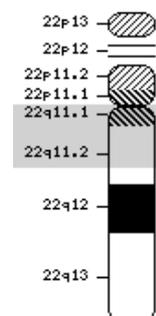


Рис. 1. Идиограмма хромосомы 22 генома человека (ISCN 2009).

Схема соответствует уровню разрешающей возможности 400 бэндов в гаплоидном наборе хромосом.

Область 22q11.2 длинного плеча хромосомы 22 связана с несколькими геномными болезнями, характеризующимися умственной отсталостью и/или врождёнными аномалиями развития. Данный регион генома объединяет группу **синдромов микроделеции 22q11.2**, а также **синдром кошачьего глаза** (СКГ, OMIM #115470), **синдром Эмануэля** (СЭ, OMIM #609029) или синдром *del(22)*, и сравнительно недавно отмеченный в литературе **синдром дупликации 22q11.2**.

Синдром микроделеции *del22q11.2* включает несколько заболеваний (уже упомянутый синдром Ди Джорджи; велокардиофациальный синдром, OMIM #192430; синдром конотрункальный с лицевыми аномалиями, OMIM #217095), каждое из которых вызвано микроделечией в сегменте q11.2 хромосомы 22. Это семейство очень близких по клинической картине хромосомных болезней является наглядным примером проявления делеций сопредельных генов. **Синдром Ди Джорджи/велокардиофациальный (СДД/В)** - наиболее распространённый у человека микроделеционный синдром с частотой встречаемости в популяции 1 на 4000-5600 новорождённых, является также примером наиболее частого геномного заболевания человека [3, 4].

Но геномные болезни могут быть вызваны как утратами, так и избытком, а также изменением ориентации фрагментов генома величиной в несколько Mb, при этом критическая область генома всегда содержит так называемые «доза-чувствительные» гены.

Для синдрома дупликации 22q11.2 характерно определенное клиническое сходство с СДД/В, но не столь тяжёлые по сравнению с СДД/В фенотипические проявления, а также высокая вариабельность клинической картины. Клиническая диагностика его крайне

затруднена, и в настоящее время специалистами признается факт гиподиагностики этого хромосомного заболевания, в силу этих обстоятельств до настоящего момента отсутствуют данные о его популяционной частоте [5].

В большинстве приведенных в литературе случаев СКГ связан с наличием в кариотипе пациента бисателлитной **добавочной малой маркёрной хромосомы (ДММХ)**. Она представляет собой *de novo* инвертированную дуплицированную хромосому 22 с точкой разрыва 22q11.2 – *inv dup(22)(q11.2)*, приводящую к частичной тетрасомии критического района СКГ. Описаны также редкие находки в виде трисомных случаев при тандемных дупликациях [6, 7].

СЭ возникает в результате наличия в кариотипе добавочной аномальной хромосомы 22, являющейся дериватом сбалансированной реципрокной транслокации *t(11;22)(q23;q11.2)*. Эта перестройка вовлекает в обмен две негомологичные аутосомы и является, пожалуй, единственным примером распространённой локус-специфической конституциональной транслокации. Заболевание связано с двойным дисбалансом в виде частичных трисомий по сегментам 11q23→qter и 22pter-q11.2 в потомстве здоровых носителей транслокации ввиду сегрегации вовлечённых хромосом в мейозе по схеме 3:1.

При каждом из этих заболеваний аномальная доза генов, расположенных в критической области 22q11.2, однако в каждом случае баланс генома нарушен по-разному. При СКГ в кариотипе имеется четыре копии критического сегмента (рисунок 2, Г), при СЭ и в случаях дупликации 22q11.2 – три копии (рисунок 2, В и Д), а в случае СДД/В одна из двух копий утрачивается и наличествует лишь одна (гемизиготное состояние) (рис. 2, Б).

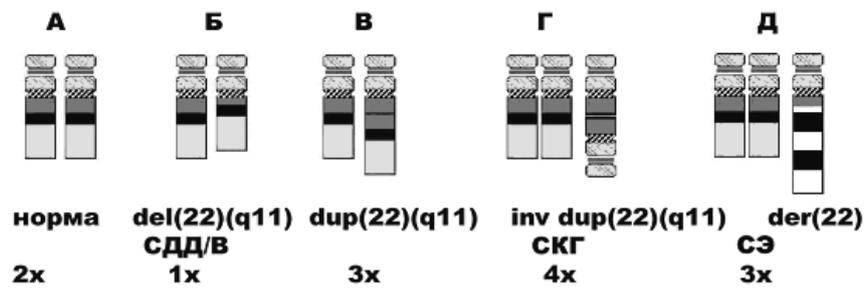


Рис. 2. Геномные болезни критической области 22q11.2 генома человека.

А. Нормальный кариотип, две гомологичные хромосомы 22. **Б.** Синдром Ди Джорджи/велокардиофациальный, микроделеция специфического участка критической области 22q11.2. **В.** Синдром дупликации 22q11.2, трисомия критической области 22q11.2. **Г.** Синдром кошачьего глаза. Добавочная инвертированная дуплицированная хромосома 22, тетрасомия критической области 22q11. **Д.** Синдром Эмануэля. Добавочная деривативная хромосома 22 с точкой разрыва-воссоединения в 22q11.2.

Сегмент 22q11.2 может быть разделен условно на несколько структурно-функциональных зон (рисунок 3). Он включает участки, в которых расположены гены, ответственные за формирование обсуждаемых болезней, а также участки повторяющихся последовательностей ДНК. Установлено, что критическая область СКГ захватывает перичентромерную часть длинного плеча и точка разрыва-воссоединения аномальной хромосомы в большинстве случаев лежит в наиболее проксимальном по отношению к центромере локусе (точка А). Однако менее распространенные случаи СКГ (тип IIa и IIb) обнаруживают дисбаланс по более протяженной области, когда затронут смежный участок до точки D. При СЭ частичная трисомия 22q11.2 охватывает область размером 4,5 Mb и перекрывает зоны СДД/В и СКГ (заштрихованная гистограмма). Область СДД/В также не однородна. Основная часть случаев синдрома вызвана делецией размером 3 Mb, но в редких вариантах обнаружена делеция иных участков ДНК «горячей» области (белая гистограмма).

Анализ «горячих» точек сегмента 22q11.2 показывает не только то, что они сосредоточены в специфических локусах: точка А на удалении от центромеры 3Mb, точка В –

4,5Mb и С – 5Mb, точка D – 6Mb (рисунок 3). Важным является и то, что эти точки разрывов являются общими для всех обсуждаемых геномных болезней. Молекулярные исследования показали, что здесь находятся высокогомолгичные **низкокопийные повторы (НКП)** ДНК.

Согласно новым данным, этот сегмент хромосомы 22 включает не менее восьми участков НКП различной протяженности, которые и обуславливают генетическую нестабильность всей области хромосомы [8, 9, 10]. Наиболее полно к настоящему времени охарактеризованы четыре наиболее проксимальные к центромере НКП от А до D (рисунок 3). Фланкирующая область размером 3Mb, самые крупные по протяженности НКП А и НКП D имеют высокую степень идентичности последовательности ДНК, достигающей по данным различных авторов от 95 до 98% [8, 11]. Это и является причиной неаллельной гомологичной конъюгации хромосом 22, а вследствие этого неравного кроссинговера, приводящего к наиболее распространенным микроделециям, микродупликациям, а также иным перестройкам в данной области генома.

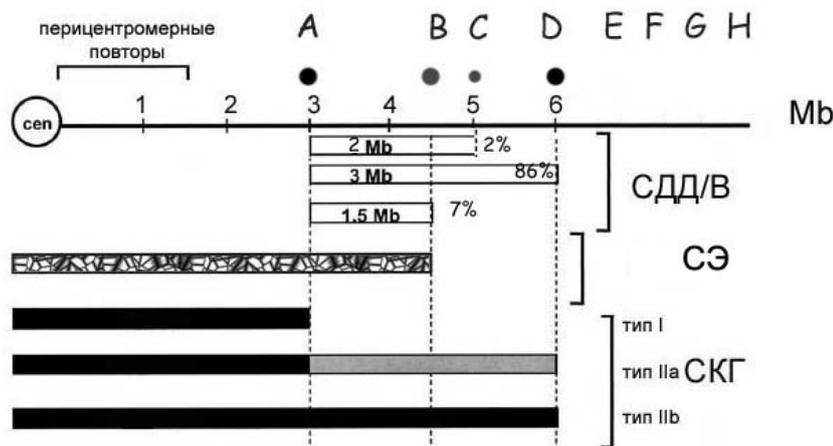


Рис. 3. Схема критической области геномных болезней в локусе 22q11.

Зоны вовлечения критической области при синдроме кошачьего глаза, микроделеции при синдроме Ди Джорджи/велокардиофациальный, при синдроме Эмануэля. Области низкокопийных повторов отмечены кругами и обозначены латинскими буквами А-Н.

Другие аномалии кариотипа в локусе 22q11

Аномалии хромосомы 22, возникающие в обсуждаемой «горячей» области кариотипа, не ограничиваются вариантами, приводящими к хромосомным болезням. Наряду с пациентами с СКГ, некоторые здоровые индивиды также имеют в своем кариотипе похожую добавочную маркерную хромосому, являющуюся инвертированной дупликацией хромосомы 22 (рисунок 2, Г). Принято считать, что точки разрывов-воссоединения этой аберрации лежат в сегменте 22q11.1, поэтому такая маркерная хромосома 22 не привносит дисбаланс в

геном и не вызывает хромосомную болезнь. Отметим, что эта аномалия кариотипа является одним из наиболее распространенных вариантов ДММХ и составляет около 26 % всех случаев всех маркерных хромосом у человека [2, 12]. Такие наблюдения не относятся к геномным болезням, однако имеют прямое отношение к обсуждаемой критической области генома. В данной работе выполнена оценка встречаемости случаев с маркерной хромосомой 22, исследовано ее строение и проанализированы варианты морфологии с помощью методов молекулярной цитогенетики.

Результаты и обсуждение

Выполнен анализ всех случаев аномалий кариотипа с вовлечением локуса 22q11, диагностированных в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» в период с 1988 по 2009 годы.

Геномные аномалии локуса 22q11 были выявлены в 23 случаях в ходе пре- (4 случая) и постнатальной (19 пациентов) цитогенетической и молекулярно-цитогенетической диагностики. Данные анализа аномальных кариотипов представлены в таблице 1. Исследованный нами материал отражает тенденции распространения в популяции обсуждаемой патологии. Спектр и частота аномалий оказались следующими: 13

пациентов (57%) имели делецию в критической области, представлен единственный (4%) случай СКГ с тетрасомией локуса 22q11.2, в пяти случаях (22%) установлен СЭ, кроме этого представлены 4 варианта (17%) наличия добавочных маркерных хромосом, образованных посредством аберрации в локусе 22q11.

Ди Джорджи/велокардиофациальный синдром. У пациента 1 (таблица 1) хромосомный дефект представлен уникальной несбалансированной реципрокной транслокацией 45,XY,der(21)t(21;22)(q22.3;q11.2),-22, возникшей *de novo* и приведшей к фактическому дисбалансу генома

с делецией критической области 22q11.2. Такие находки редки в практике и представляют пример иных конституциональных перестроек хромосомы 22 в «горячем» локусе, приводящих к формированию СДД/В. В случаях 2 и 8 (таблица

1) диагноз микроделеции 22q11.2 предполагался клинически ввиду обнаружения характерных врождённых пороков сердца в ходе пренатального УЗИ-скрининга в первом триместре беременности.

Таблица 1

Аномалии кариотипа у пациентов с геномными аномалиями в локусе 22q11

Код пациента	Кариотип	Диагностика в пре- или постнатальном периоде
Синдром Ди Джорджи/велокардиофациальный (СДД/В)		
1	45,XY,der(21)t(21;22)(q22.3;q11.2),-22dn	Пост-
2	46,XX,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)dn	Пре-
3	46,XY,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)dn	Пост
4	46,XY,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)dn	Пост
5	46,XY,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)mat	Пост
6	46,XX,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)pat	Пост
7	46,XY,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)	Пост
8	46,XY,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)	Пре-
9	46,XX,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)	Пост
10	46,XX,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)	Пост
11	46,XX,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)	Пост
12	46,XY,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)	Пост
13	46,XX,ish del(22)(q11.2q11.2)(N25-)	Пост
Синдром кошачьего глаза (СКГ)15		
14	47,XX,+inv dup(22)(q11.2)dn	Пост-
Синдром Эмануэля		
15	47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)pat	Пост
16	47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)mat	Пост
17	47,XX,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)mat	Пост
18	47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)mat	Пост
19	47,XY,+der(22)t(11;22)(q23;q11.2)mat	Пре-
Добавочная малая маркёрная хромосома		
20	47,XX,+inv dup(22)(q11.1)dn	Пост
21	47,XX,+inv dup(22)(q11.1)[22]/46,XX[28]dn	Пост
22	47,XX,+inv dup(22)(q11.1)	Пост
23	47,XX,der(22),+mar/46,XX,der(22) I+II[1]/I+IV[1]/I+III[1]/II[1]/III[8]/I[1](пояснения в тексте)	Пре-

Микроделеция и диагноз СДД/В в обоих случаях установлены *postmortem* с помощью метода FISH на материале тканей плодов, абортированных по медицинским показаниям ввиду наличия несовместимых с жизнью врожденных пороков развития. В случае 2 удалось установить, что хромосомный дефект возник спорадически, то есть родители имели нормальный кариотип. Микроделеция и СДД/В диагностированы также у 11 пациентов постнатально. Отметим, что взрослым пациентам 7 и 10 (таблица 1), имеющим «мягкое» проявление характерных для СДД/В фенотипических признаков, была предложена диагностика методом FISH ввиду установления микроделеции у их ребёнка. Так нами было обнаружено два семейных случая микроделеции 22q11.2, что составило 18% наследуемых форм СДД/В.

Механизм неравного кроссинговера предполагает одинаковую частоту формирования делеций и дупликаций критической области. Ввиду единого механизма формирования хромосомного дефекта можно предполагать столь же многочисленную группу пациентов с синдромом микродупликации 22q11.2. Диагностика такого хромосомного дефекта выполняется как на метафазах клеток, так и на интерфазных клетках пациента. Была обследована группа риска из 52 пациентов с врождёнными пороками сердца, аномалиями лица, особенностями психо-речевого и/или физического развития, иммунодефицитным состоянием, гипо- или аплазией тимуса, а также другими клиническими проявлениями. Однако синдром микродупликации 22q11.2 как один из вариантов патологии локуса 22q11.2 в ходе молекулярно-цитогенетической диагностики нами не обнаружен. Успех диагностики этого нового синдрома состоит в разработке подходов к формированию адекватной группы риска. Это, в свою очередь, диктует необходимость уточнения и обсуждения в мировой литературе характера мажорных и минорных фенотипических признаков и систематизации новых данных о степени их клинического полиморфизма.

Синдром Эмануэля. Всего проанализировано 5 наблюдений, среди которых один случай диагностирован пренатально. В четырех семьях из пяти (80%) (случаи 16, 17, 18, 19, таблица 1) носителем сбалансированной локус-специфической реципрокной транслокации оказалась мать, в одном – отец ребёнка. Преобладание наследования добавочной ано-

мальной деривативной хромосомы от матери является характерным. Так, по данным Carter с соавторами (2009), аномалию кариотипа, приводящую дисбаланс в геном и приводящую к заболеванию, в 90% случаев ребенок с СЭ наследует от матери [10]. В случае 15 (таблица 1) постнатальное кариотипирование пробанда и его родителей показало, что аномальная хромосома унаследована от отца, являющегося носителем сбалансированной конституциональной перестройки, что является редким наблюдением.

Аномальные процессы мейоза I у носителей сбалансированной реципрокной транслокации $t(11;22)$ приводят к двойной частичной трисомии участков генома $22pter \rightarrow 22q11.2$ и $11q23 \rightarrow 11qter$ у плода/ребёнка. Точки разрывов-воссоединения этой аберрации также находятся в НКП в критической области 22q11.2. Случаи 17 и 18 – внутрисемейное наблюдение двух разнополых sibсов с СЭ, имеющих в высокой степени конкордантный фенотип.

Синдром кошачьего глаза. СКГ является, напротив, относительно редким заболеванием, связанным с тетра-, в редких случаях с трисомией 22q11.2 [13]. К настоящему времени установлено, что точки разрыва при этой перестройке варьируют, а, следовательно, и степень дисбаланса при СКГ также может различаться. В нашем исследовании представлено одно наблюдение этого редкого синдрома у пробанда с типичной аномалией кариотипа, верифицированной методом FISH (пациент 14, таблица 1) и характерными для СКГ фенотипическими проявлениями.

Добавочная маркёрная хромосома у здоровых лиц. Принципиальное отличие таких аномальных вариантов кариотипа $47,+mar$ при нормальном фенотипе состоит в том, что ДММХ имеет иную, более проксимальную точку разрыва, также лежащую в локусе 22q11. Поэтому у этих пациентов маркёрная хромосома не имеет в своем составе «фенотипически значимых» участков генома и не вызывает аномалий фенотипа. Пациенты 20, 21 и 22 (таблица 1), диагностированные нами постнатально, были с нормальным фенотипом. При анализе их кариотипа было установлено, что два из них имели регулярную форму носительства аномальной хромосомы, а в одном случае ДММХ была мозаична.

Первоначально была определена природа мар-

кёрной хромосомы с использованием многоцветных методов центромера-специфической FISH – cenM-FISH или ascocenM-FISH. Охарактеризовать строение ДММХ во всех случаях удалось с помощью специального метода subcenM-FISH. Анализ состава маркёрной хромосомы по результатам гибридизации комбинированной ДНК-пробы при использовании метода subcenM-FISH на обе гомологичные хромосомы 22 выполнен с помощью компьютерной программы ISIS (Metasystems). Было показано, что специфическая центромерная проба для хромосомы 22 даёт два сигнала на аномальной хромосоме, т.е. маркёр имеет дицентрическое строение; проба для проксимальной эухроматиновой области 22q11.2 (BAC-клон *RP11-172D7*) не гибридизируется на маркёр и сигнал отсутствует; микродиссекционная ДНК-библиотека для длинного плеча хромосомы 22 (pcr#22q) даёт сигнал в области между центромерами маркёра, и микродиссекционная ДНК-библиотека для ядрышкоорганизующего района акроцентрических хромосом указывает на то, что маркёрная хромосома имеет бисателлитное строение. С помощью анализа такой последовательности диагностических гибридизаций *in situ* для случаев 20, 21 и 22 был установлен диагноз – *inv dup(22)(q11.1)*.

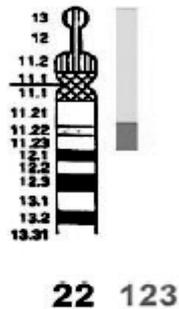


Рис. 4. Фенотипический эффект избытка материала хромосомы 22 в кариотипе человека. Светло-серая гистограмма – нет фенотипического эффекта, тёмно-серая гистограмма – присутствие фенотипического эффекта в виде хромосомной болезни.

Однако по данным анализа 123 собственных и литературных случаев показано, что значи-

тельный по размеру участок сегмента 22q11.2 может присутствовать в избыточной дозе в геноме, не приводя при этом дисбаланс и не вызывая хромосомную болезнь (рисунок 4) [12]. Сегмент 22q11.21 «нейтрален» с точки зрения фенотипических проявлений, и избыток генетического материала этого района хромосомы в виде три-/тетрасомии (целиком либо его фрагмента) не приводит к патологии [12]. Таким образом, правомерно полагать, что в части случаев фенотипически нормальные носители добавочной маркёрной хромосомы 22 могут иметь фактический дисбаланс по эухроматину «горячей» области 22q11.2, что удастся установить с применением такого информативного метода, как cenM-FISH.

В пренатальной диагностике случая 23 (таблица 1) с помощью анализа FISH была установлена сложная аномалия кариотипа у плода, беременность которым была отнесена к группе риска и оказалась патологической по результатам комплекса пренатальных мероприятий – пренатальный биохимический скрининг, УЗИ-скрининг, пренатальное кариотипирование плода. Кариотип клеток амниотической жидкости плода имел сложный мозаицизм и включал шесть различных аномальных клонов. Каждая клеточная линия имела 46 или 47 хромосом и, наряду с одной нормальной хромосомой 22 несла, соответственно, одну или две аномальные хромосомы 22 с аберрацией в точке 22q11.1:

47,XX,I+II[1]/47,XX,I+IV[1]/47,XX,I+III[1]/46,XX,II[1]/46,XX,III[8]/46,XX,I[1]. Аберрантная аутосома 22 была представлена тремя вариантами кольцевых хромосом, два из них были образованы в результате комплексной перестройки. Третьим вариантом аномалии была деривативная хромосома *der(22)(:q11.1→p12::→p12→q11.1:)* (III). Кольцевые хромосомы 22 имели следующее строение: I - *r(22)(:p12→q11.1:p11.1→q11.1:q11.1→p12:)*; II *r(22)(:p11.1→q11.1:p11.1→q11.1:)*; IV *r(22)(:p12→q11.1:)* (таблица 1).

Заключение

Представленный анализ геномных болезней в локусе 22q11, а также иных форм хромосомных аномалий этой «горячей» области генома человека выполнен в белорусской

популяции впервые. Данные молекулярно-цитогенетических исследований позволяют предполагать наличие новых синдромальных форм геномных болезней в локусе 22q11, не вы-

явленных в Беларуси к настоящему моменту. В то же время, в Беларуси имеются современные лабораторные подходы к диагностике всех рассмотренных в работе сложных форм хромосомной патологии локуса 22q11. Дальнейший анализ и систематизация знаний о корреляции «генотип-фенотип», а также выяснение механизмов аберраций хромосом позволит углубить понимание

природы генетических заболеваний и совершенствовать их диагностику и профилактику.

Авторы выражают искреннюю благодарность за сотрудничество всем коллегам, работающим в клинично-диагностической генетической лаборатории ГУ «РНПЦ «Мать и дитя», а также в областных медико-генетических центрах Беларуси.

Список использованных источников

1. Lupski, J.R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits / J.R. Lupski // *Trends. Genet.* – 1998. – №14. – P. 417-22.
2. Политыко, А.Д. Высокоразрешающие методы молекулярной цитогенетики в изучении маркерных хромосом / А.Д. Политыко., Г.И. Лазюк, Т. Лир // *Медицинская генетика.* – 2008. – Т. 7, №3(69). – С. 34-40.
3. Congenital heart disease / F. Burn [et al.] // *Emory's and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, 3rd edn. Churchill Livingstone, New York. – 1996. – Vol. 1. – P. 767-828.
4. A population-based study of the 22q11.2 deletion / L.D. Botto [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 69. – P. 583.
5. Portnoï, M.F. Microduplication 22q11.2: A new chromosomal syndrome // *E. J. Med. Genet.* – 2009. – Vol. 52, I. 2-3. – P. 88-93.
6. Interstitial duplication of proximal 22q: Phenotypic overlap with cat eye syndrome / J.H. Knoll [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1995. – Vol. 55. – P. 221-224.
7. Phenotypic variability of the cat eye syndrome: case report and review of the literature / P.R. Rosias [et al.] // *Genet. Couns.* – 2001. – Vol. 12. – P. 273-282.
8. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review / T.H. Shaikh [et al.] // *Genet. Med.* – 2001. – Vol. 3. – P. 6-13.
9. Emanuel, B.S. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22 q11.2 rearrangements // *Dev. Disab. Res. Rev.* – 2008. – Vol. 14. – P. 11-18.
10. Phenotypic delineation of Emanuel syndrome (supernumerary derivative 22 syndrome) Clinical features of 63 individuals / M.T. Carter [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2009, part 149A. – P. 1712-1721.
11. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders / P. Stankiewicz [et al.] // *Trends. Genet.* – 2002. – Vol. 18. – P. 74-82.
12. Small supernumerary markerchromosomes – progress towards a genotype-phenotype correlation / T. Liehr [et al.] // *Cytogenet. Genome. Res.* – 2006. – Vol. 112: 1-2. – P. 23-34.
13. Partial trisomy of chromosome 22 resulting from an interstitial duplication of 22q11.2 in a child with typical cat eye syndrome / B. Meins [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2003. – Vol. 40. – P. e62.

Дата поступления статьи 20 августа 2009 г.

О.В. Квитко, И.И. Конева, Я.И. Шейко, В.Д. Трусова, С.Н. Шевцова, Н.А. Балашенко, А.С. Сапун, С.Е. Дромашко

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОЙ ВИДЕОМИКРОСКОПИИ ЖИВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ И ТОКСИКОЛОГИИ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Компьютерная видеомикроскопия живых клеток является перспективным современным методом исследования таких фундаментальных биологических процессов как клеточное старение, дифференцировка и раковая трансформация. Кроме того, выполняемый с помощью этого метода детальный анализ процессов пролиферации, дифференцировки и гибели отдельных клеток и их клонового потомства важен для разработки клеточных технологий в медицинской трансплантологии, сельском хозяйстве и охране окружающей среды.

Нами разработаны высокоэффективные методы витального анализа эффектов внешних факторов на культивируемые клетки человека и животных, основанные на учете событий в клеточной популяции во времени, причем для получения детальной информации используется непрерывная круглосуточная компьютерная видеозапись одного участка культуры клеток в течение ряда дней. Видеозапись живых клеточных культур выполняется с помощью инвертированного микроскопа и видеокамеры, соединенной с компьютером.

Открытие явления старения клеток *in vitro*, т.е. затухания клеточного деления и последующей гибели клеток связано с работой Леонарда Хайфлика [1]. В работах немецких исследователей под руководством Клауса Байройтера [2] сообщалось, что в культурах фибробластов человека и животных, которые ранее считались гомогенными клеточными популяциями, происходят процессы семистадийной дифференцировки, приводящие к накоплению постмитотических клеток. Если бы схема Байройтера была подтверждена, она могла бы служить

удобной моделью для изучения эпигенетических механизмов дифференцировки и старения, а также раковой трансформации клеток. С помощью прижизненной компьютерной видеомикроскопии мы исследовали вопрос о существовании поэтапного изменения клеточного морфотипа в культурах эмбриональных фибробластов человека и мыши. На основании полученных видеозаписей в течение ряда последовательных митотических делений нами были составлены клеточные генеалогии, напоминающие родословные в генетике человека. Клетки-родоначальницы и их потомки в течение ряда поколений изучались по многим признакам. Учитывалось до 20 параметров, таких как площадь и форма клетки, моменты митоза или клеточной гибели, аномальные митозы, размер и количество ядер, процессы клазматоза (отделения фрагментов цитоплазмы), скорость и характер перемещений клеток. Было установлено, что в популяциях фибробластов человека и мыши отсутствуют морфотипы, которые эпигенетически наследуются в клеточных поколениях [3].

Человек и мышь – виды млекопитающих, контрастные по продолжительности жизни, а также частоте возникновения онкологических заболеваний, которая у грызунов на несколько порядков выше, чем у человека [4]. Выяснение причин этих огромных межвидовых различий принципиально важно для познания механизмов старения и возникновения раковых заболеваний. В этой связи представляют интерес наши исследования взаимосвязи между клеточной пролиферацией и размером клетки в культурах фибробластов человека и мыши [5]. При изучении зависимости митотической

активности от площади клеток было отмечено, что у фибробластов человека не делятся наиболее крупные клетки, чья площадь превышала 2300 мкм². В то же время в культуре фибробластов мыши крупные клетки делились так же активно, как клетки малых размеров. На наш взгляд, это явление объясняется тем, что в клетках человека имеется более надежная система регуляции пролиферации, ограничивающая деление крупных клеток. Среди больших клеток чаще встречаются постаревшие и полиплоидные клетки, которые при делении с большей вероятностью могут продуцировать дисфункциональные или трансформированные клетки. Тот факт, что крупные клетки человека не делятся, в отличие от крупных клеток мыши, может быть причиной резких различий данных видов млекопитающих в скорости старения и частоте раковой трансформации [5].

В соответствии с концепцией о неозисе, предложенной канадским исследователем Р. Раджараманом, от крупных полиплоидных клеток посредством немитотического цитокинеза могут отделяться мелкие клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом [6]. Однако в нашей работе при анализе видеозаписей стареющих и иммортальной клеточных культур не встречалось ни одного случая образования клеток немитотическим путем [7-8]. Исследователи, описывающие такой тип клеточного деления, на самом деле могли наблюдать процесс клазматоза, т.е. отделение участков безъядерных фрагментов цитоплазмы.

По нашему мнению, образование трансформированных клеток может происходить путем аномальных митотических делений, а не посредством процесса неозиса. При аномальных митозах, приводящих к нарушению хромосомного состава, может происходить амплификация онкогенов и потеря гетерозиготности генов – супрессоров клеточного деления, что ведет к образованию трансформированных клеток. Для анализа данного вопроса мы провели исследования на иммортализированной линии, полученной нами в процессе культивирования фибробластов из эмбрионов линий мышей Af. Изучали роль аномальных митозов в образовании клеток с увеличенным пролиферативным потенциалом, а также суб-

клональную гетерогенность иммортальной культуры в отношении пролиферации и гибели клеток [7-8].

Был проведен эксперимент по продолжительной видеозаписи участка иммортальной культуры. С помощью специально разработанной компьютерной программы, позволяющей маркировать клетки и регистрировать различные клеточные параметры (данная программа включена в государственный регистр информационных ресурсов), была проанализирована видеозапись, соответствующая 15 суткам реального времени. В результате составлена клеточная генеалогия, включающая до 8 поколений клеток. Выяснилось, что клетки, возникшие в результате аномальных (трехполюсных и асимметричных биполярных) митозов, обычно не погибают, а напротив, способны к активному делению, что особенно ярко демонстрируется трехполюсными делениями. Возникающие в результате трехполюсного митоза три дочерние клетки, как правило, обладали высокой пролиферативной способностью и генерировали субклоны. Таким образом, аномалии митотического деления, с повышенной вероятностью приводящие к хромосомным нарушениям, могут вносить вклад в поддержание иммортализированного состояния и вести к прогрессии канцерогенеза.

В культурах полученной нами иммортальной линии образовывались очаги аномального многослойного роста клеток, которые отмечали другие исследователи на постоянных линиях [8]. Нами было запланировано изучить формирование многослойных клеточных очагов для проверки данных литературы о том, что такие очаги формируются путем клонального размножения единичных мутировавших клеток. Многослойные клеточные скопления образовывались в результате агрегации, а не за счет клонального размножения мутировавших клеток. Так было установлено, что свойство образовывать многослойные агрегаты из отдельных живых клеток характеризует всю иммортальную популяцию, а не обусловлено локальной пролиферацией мутировавших клеток.

Одним из подходов к исследованию эпигенетических механизмов старения и раковой трансформации является использование маркеров, характеризующих экспрессию генов. В

этой связи представляет интерес молекулярный маркер клеточного старения – экспрессия гена бета-галактозидазы. Результаты наших исследований свидетельствуют о целесообразности сочетания методов компьютерной видеомикроскопии живых клеток и данного теста.

Количество клеток, экспрессирующих бета-галактозидазу, повышается при старении в тканях организма и в клеточных культурах [9]. В литературе имеются также данные о проявлении этого маркера не только в стареющих, но и в иммортальных клеточных популяциях *in vitro*, а также в опухолях в организме. В нашей работе было выполнено сравнение экспрессии гена бета-галактозидазы в нормальных и иммортализированных клеточных культурах [9]. Полученные данные свидетельствовали о присутствии в иммортальных популяциях двух субпопуляций – стволовой линии и фракции стареющих клеток, чему соответствуют и результаты анализа клеточной генеалогии иммортальной культуры. Так, клоновое потомство одних клеток характеризовалось высокой пролиферативной активностью, в то время как другие клоны в основном были представлены медленно делящимися клетками. Следовательно, в иммортализированной популяции могут существовать субклоны, в которых ослабление пролиферативной активности наследуется и прогрессирует, что может положительно коррелировать с экспрессией маркера клеточного старения, каким является ген бета-галактозидазы.

Важным аспектом антираковой терапии является гетерогенность популяции раковых клеток. Клеточная фракция, представленная раковыми стволовыми клетками, может отвечать за неограниченную пролиферацию опухоли. Нами разработаны методы анализа клоновой структуры клеточных популяций на основе

компьютерной видеомикроскопии живых клеток. Установлено, что часть клеток линии рака легкого A549 формирует клоны, которые после нескольких репликаций стареют и погибают, в то время как другие клетки (иногда небольшая часть) генерируют бесконечно растущие (потенциально бессмертные) клоны [11]. В этой связи особый интерес имеет поиск средств эпигенетической терапии, индуцирующих дифференцировку раковых стволовых клеток в направлении клеточного старения и гибели. Натуральные и синтетические полинуклеотиды (ДНК и РНК) являются перспективным источником для создания антираковых препаратов. Нами обнаружен резко выраженный ингибирующий эффект ДНК эритроцитов цыплят (100 мкг/мл), добавляемой в среду для культивирования клеток HeLa [12]. Представляется целесообразной разработка клеточных систем для подбора полинуклеотидных препаратов (варьирующих по нуклеотидной последовательности и размеру фрагментов), а также других средств, направляющих эпигенетическую изменчивость раковых клеток в сторону пролиферативного старения и гибели.

В настоящей работе представлены полученные с помощью компьютерной видеомикроскопии живых клеток результаты наших исследований, направленных на разработку клеточных технологий для медицинской трансплантологии, животноводства и токсикологии. Приведены данные о получении линии клеток из фолликулов волос человека, способных к нейтральной дифференцировке, а также линии клеток гранулезы яичника коров. Кроме того, на примере клазматоза (процесса отделения фрагментов цитоплазмы) показано, что компьютерная микроскопия может способствовать выбору тестов для токсикологического мониторинга.

Материалы и методы

Получение и анализ культуры клеток из фолликулов волос человека. Несколько (1-5) волос на затылочной части головы захватывали пинцетом (ближе к концам волос, а не к коже) и извлекали резким движением. При этом значительная часть волос извлекалась вместе с фолликулами. Фолликулы от 10 волос отрезали стерильными ножницами и помещали в

центрифужную пробирку с раствором Хэнкса с 10-кратной (по сравнению с обычной при культивировании клеток) концентрацией (5 мкг/мл) антибиотиков (пенициллина, стрептомицина, гентамицина и амфотерицина В). После 30 минут выдерживания в концентрате антибиотиков при комнатной температуре и центрифугирования (1000 об./мин, 10 мин.)

удаляли супернатант и для отмывания антибиотиков добавляли раствор Хэнкса, снова выполняли центрифугирование и удаляли супернатант.

Фолликулы помещали в небольшой культуральный сосуд и добавляли ростовую среду (1,5 мл), состоящую из среды Игла, 10% сыворотки эмбриона телят и 10% стерилизованной фильтрацией жидкости из фолликулов яичника коров, а также пенициллина и стрептомицина (0,5 мкг/мл). После добавления CO₂ (5% от объема сосуда) с помощью шприца сосуд герметически закупоривали резиновой пробкой, и материал фолликулов культивировали при 37°C. В дальнейшем в процессе культивирования анализировали культуру с помощью инвертированного микроскопа, а при нахождении отдельных клеток и небольших клеточных групп выполняли их компьютерную видеосъемку с целью проверки их жизнеспособности и пролиферативной активности. После получения размножающейся культуры пересевы в новые каррели выполняли без применения трипсина, переносом культуральной среды, содержащей суспензию открепившихся от ростовой поверхности пролиферативно активных единичных клеток и клеточных агрегатов.

Для дифференцировки клеток использовали временное (в течение нескольких дней) культивирование при пониженной температуре (30°C). Обратный перенос культуры в нормальные температурные условия производили после начала значительной гибели клеток, что регистрировали компьютерным фотографированием выбранных участков ростового субстрата с клетками в разные сроки культивирования. Таким же способом учитывали пролиферацию, гибель и дифференцировку клеток. Дополнительные процедуры изложены в разделе «Результаты и обсуждение». Для непрерывной компьютерной видеосъемки в термостатируемую (37°C) камеру инвертированного микроскопа. Видеосъемку живых клеток выполняли с частотой 1 кадр в минуту.

Получение и анализ культуры клеток гранулезы из фолликулов яичника коров. Яичники, полученные на Минском мясокомбинате, после транспортировки в растворе Хэнкса с десятикратной концентрацией антибиотиков

(см. выше) трижды промывали тем же раствором. Фолликулярную жидкость, содержащую клетки гранулезы, получали посредством аспирации фолликулов с помощью шприца. Фолликулярную жидкость центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин (для отделения клеток гранулезы) и фильтровали через миллипорный бактериальный фильтр (0,2 мкм) для дальнейшего использования в качестве добавки к культуральной среде, а клетки гранулезы трижды отмывали от фолликулярной жидкости (суспендировали осадок клеток в растворе Хэнкса и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут). После суспендирования в культуральной среде (Среда RPMI + 10% сыворотки эмбриона телят + антибиотики) клетки помещали в культуральный сосуд, добавляли 5% CO₂, сосуд герметически закупоривали и культивировали клетки при 37°C. В некоторых экспериментах осуществляли компьютерную видеозапись (см. выше).

Изучение цитогенетических эффектов диазиквона на клетки линии рака легкого A549. Клетки высевали при малой плотности (для удобства анализа под микроскопом) в культуральной среде (Среда RPMI + 10% сыворотки эмбриона телят + антибиотики) в культуральные сосуды с вкладышами, изготовленными из стандартных предметных стекол (slides) толщиной 1 мм. После добавления CO₂ (5% объема) с помощью шприца сосуды герметически закупоривали и культивировали клетки при 37°C.

После 2 дней культивирования в опытные культуральные флаконы добавляли концентрат диазиквона (0,1 мг/мл в культуральной среде RPMI, растворение проводили с использованием водяной бани при 60°C), предварительно отбирая из флаконов соответствующие объемы культуральной среды. Затем клеточные культуры снова выращивали при 37°C в течение 2 дней, после чего клетки на стеклянных вкладышах фиксировали в восходящих растворах этанола (24, 48 и 96%) и окрашивали по Гимза. Стекла с окрашенными клетками высушивали на воздухе при комнатной температуре и анализировали препараты с помощью микроскопа.

Дополнительные детали методики приведены в следующем разделе статьи.

Результаты и обсуждение

Получение и анализ культуры клеток из фолликулов волос человека. Перспективы развития клеточных технологий для лечения ряда заболеваний во многом зависят от разработки нетравматичных и экономичных методов получения значительных количеств аутологичных (собственных) клеток, культивируемых *in vitro*. Применение именно аутологичных клеток особенно важно, поскольку при этом устраняются проблемы, связанные с иммунными реакциями, вызываемыми введением в организм генетически инородного клеточного материала. В этом плане наиболее перспективным представляется продуцирование *in vitro* клеток из фолликулов волос человека, которые являются источником мультипотентных стволовых клеток или клеток-предшественников, способных в подобранных условиях культивирования дифференцироваться в клетки различных типов, включая нервные [13]. Особый интерес с практической точки зрения вызывает возможность получения аутологичных клеток не обычным методом, требующим хирургического иссечения участка скальпа [13], а из фолликулов выщипываемых волос [14]. При этом важно разработать методы культивирования, обеспечивающие массовую наработку клеток *in vitro* из небольшого количества фолликулов (в идеале из одного).

При получении культуры клеток из малого количества исходного материала тщательный мониторинг клеточных культур с помощью компьютерной видеомикроскопии значительно повышает эффективность работы, поскольку при отсутствии условий культивирования, оптимизированных для нового источника клеток, критически важным является обнаружение хотя бы одного небольшого пролиферирующего клона, из которого можно в дальнейшем получить клеточную линию.

В нашей работе после 1 дня культивирования фолликулов волос в культуре была обнаружена небольшой компактной группой округлых клеток (приблизительно 20), которая могла появиться за такой короткий срок не путем деления одной клетки на субстрате, а в результате прикрепления и распластывания клеточного агрегата, находящегося во взвеси в культуральной среде. Компьютерная виде-

осъемка этой группы клеток в течение 1 дня позволила зарегистрировать 2 митотических деления, а еще через 3 дня число клеток увеличилось почти в 3 раза.

В течение нескольких следующих дней в культуре было найдено еще несколько небольших групп клеток, которые, по-видимому, также прикрепилась к субстрату из культуральной среды. Однако видеосъемка зарегистрировала постепенное затухание делений, а также медленную конденсацию и обездвиживание клеток.

После 12 дней культивирования была обнаружена относительно крупная компактная группа клеток (средний диаметр приблизительно 150 мкм), прикрепленная к фрагменту волоса (длиной приблизительно 1 мм). В дальнейшем эта группа клеток увеличивалась, занимая все большую площадь. Через 2 дня для стимулирования клеточных делений в культуральный сосуд была добавлена жидкость из фолликулов яичника коров, обладающая пролиферативным эффектом на клетках гранулы (см. ниже). Для этого в культуральном флаконе третью часть среды заменили фолликулярной жидкостью. На 26 день клеточный агрегат значительно вырос (средний диаметр приблизительно 1 мм), причем увеличилась не только площадь, но и (судя по увеличению оптической плотности) толщина клеточного агрегата. Затем с увеличением клеточного агрегата на различных участках ростовой поверхности появились вторичные агрегаты и одиночные клетки, формирующие клоны. Это происходило в результате открепления в среде клеток и небольших клеточных скоплений от первого агрегата и последующего распластывания на субстрате. Таким образом, была получена характерная для линий стволовых клеток полусуспензионная клеточная культура, растущая как на субстрате, так и в среде. Такие культуры удобно размножать без использования трипсина (который используется для снятия клеток с ростового субстрата), путем перенесения среды с клетками в новый культуральный сосуд. Отдельные клетки или небольшие агрегаты, прикрепляясь к субстрату, быстро пролиферировали (рис. 1) и формировали новую культуру.

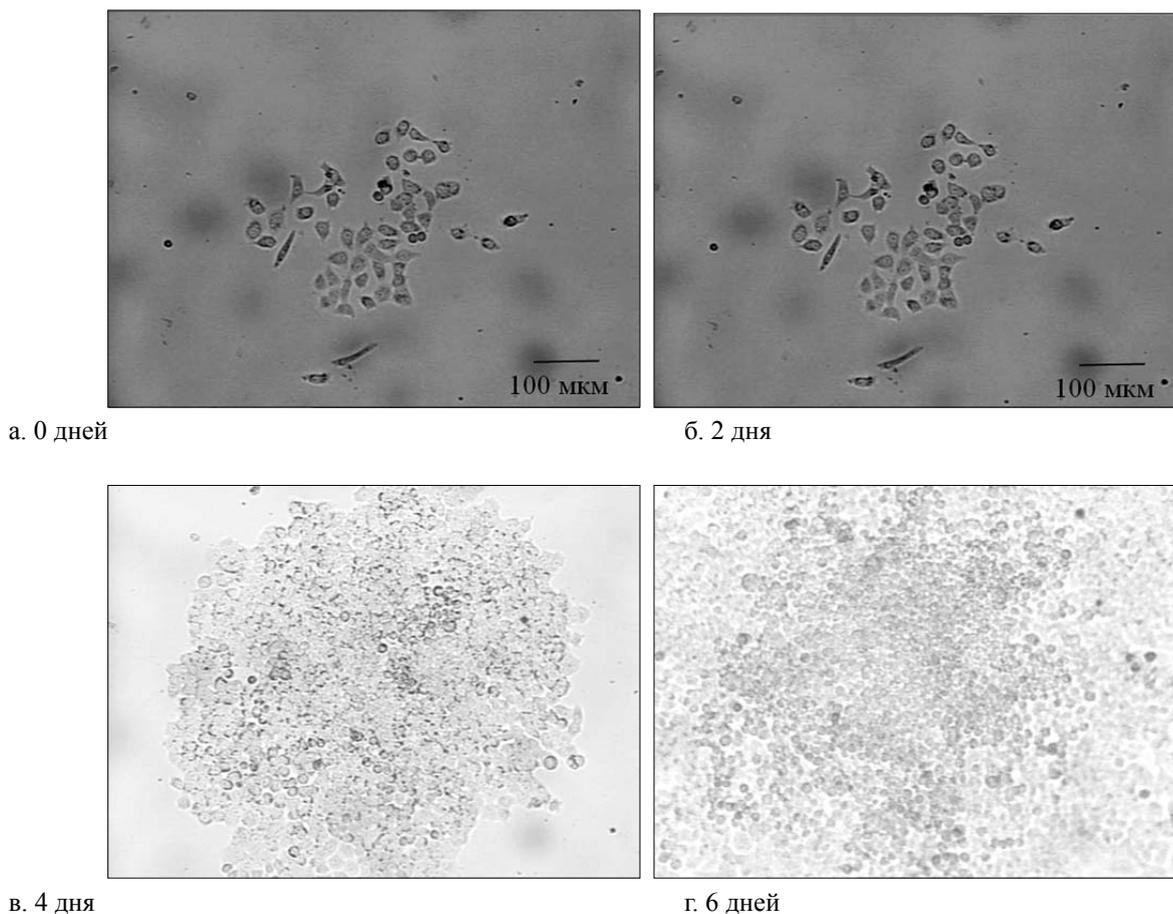


Рис. 1. Рост клона клеточной линии из фолликулов волос человека.

В дальнейшем (после 2 месяцев от начала культивирования фолликулов) посредством переноса среды с клетками в новые флаконы были получены культуры, поддерживаемые ежедневной сменой среды (включающей среду Игла, 10% эмбриональной сыворотки телят, 10% жидкости из фолликула яичника коров и антибиотики). Для экспериментов использовали культуры, полученные переносом среды с клетками.

Было отмечено, что в некоторых культурах, в которых среду длительно (в течение нескольких недель) не меняли, наряду с гибелью части клеток происходила дифференцировка, при которой появлялись клетки, морфологически сходные с нейральными (нейронами и олигодендроцитами), а также клетки с крупными вакуолями, занимающими большую часть клеточного объема. Видеозапись позволила заключить, что эти клетки являются постмитотическими, т.е. утрачивают способность к делению.

Для прекращения делений клеток и индус-

цирования дифференцировки предварительно выращенные при 37°C культуры переносили в термостат с пониженной температурой (30°C). Этот прием использован нами на основании сообщения о дифференцировке стволовых клеток тератокарциномы мыши при температуре 31°C [15]. Культивирование клеток при пониженной температуре применяется также в производстве рекомбинантных белков [16].

В одном из экспериментов клетки были посеяны при малой плотности и культивировались при 37°C. Через 6 дней из небольших клеточных агрегатов и отдельных клеток сформировались многоклеточные клоны, после чего культивирование продолжали при 30°C. Ежедневно выполняли компьютерное фотографирование 29 участков ростовой поверхности.

В течение первых 10 дней культивирования при 30°C на всех участках происходило массовое изменение клеток в направлении нейральной дифференцировки, что проявлялось в появлении тонких длинных выростов, характерных для нейральных клеток. Степень изменения клеток

увеличивалась день за днем, но к 16 дню количество клеток начало уменьшаться.

После 19 дней культивирование продолжали при 37°C. Дифференцированные клетки не делились и нередко достигали очень крупных размеров, существуя в культуре до нескольких десятков дней. При этом были установлены некоторые неизвестные ранее особенности процесса дифференцировки.

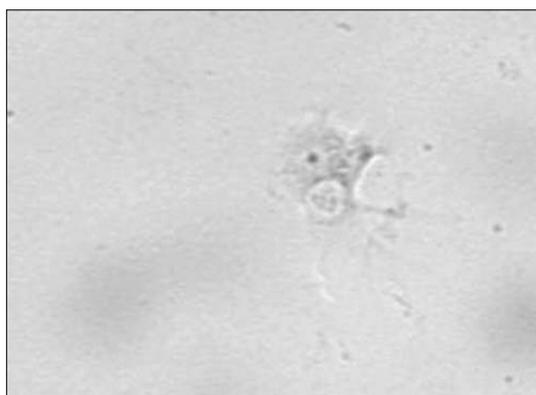
На рисунке 2 представлен процесс формирования дендритоподобных выростов на протяжении 6 дней.

Часто обнаруживались пары близко расположенных очень сходных по морфологии дифференцированных клеток, связанных друг с другом посредством межклеточных контактов. Это свидетельствует о симметричной дифференцировке, при которой дифференцируются обе сестринские клетки (рис. 3). В этом плане следует отметить, что в последние годы

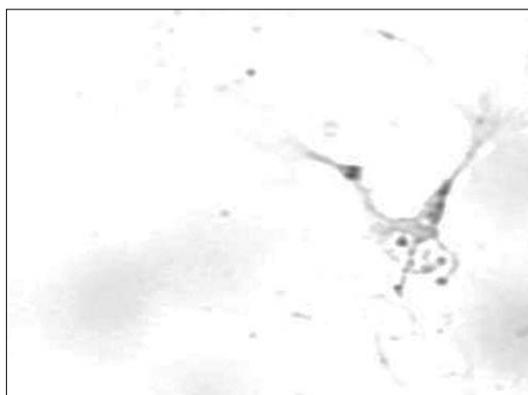
появились работы, демонстрирующие случаи симметричной дифференцировки стволовых клеток [17], хотя ранее полагали, что дифференцировка происходит только асимметричным путем, когда дифференцируется одна из двух сестринских клеток.

Было также зарегистрировано слияние двух сестринских дифференцированных клеток в двуядерную клетку (сохранивших связь в виде тонкой нитевидной цитоплазматической перетяжки), причем оба ядра располагались рядом (рис. 4). Данное наблюдение демонстрирует один из механизмов образования постмитотических полиплоидных клеток.

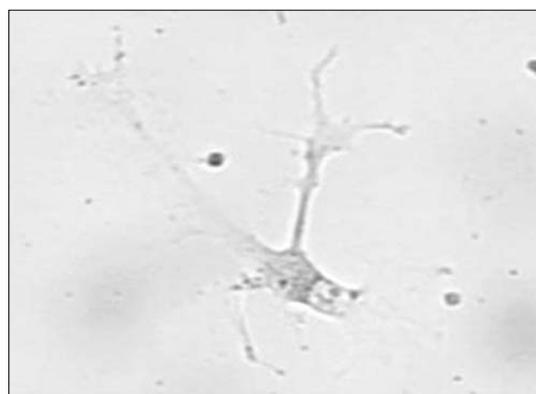
Таким образом, показана возможность получения перспективных для аутологичной трансплантации культур клеток, способных к дифференцировке, из небольшого количества фолликулов волос, легко извлекаемых без травматичных хирургических процедур.



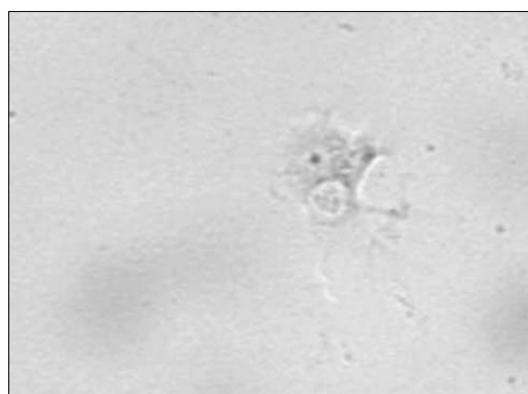
а. 0 дней



б. 2 дня



в. 4 дня



г. 6 дней

Рис. 2. Нейральная дифференцировка в клеточной линии из фолликулов волос человека.

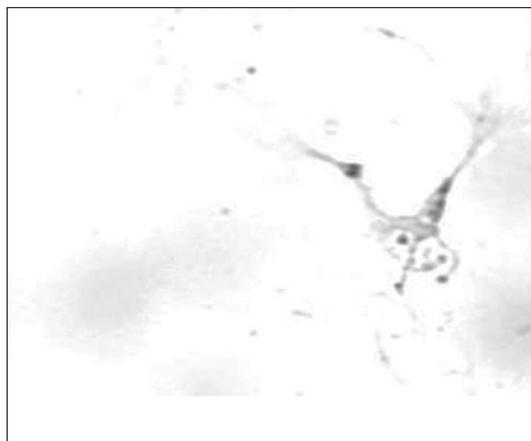
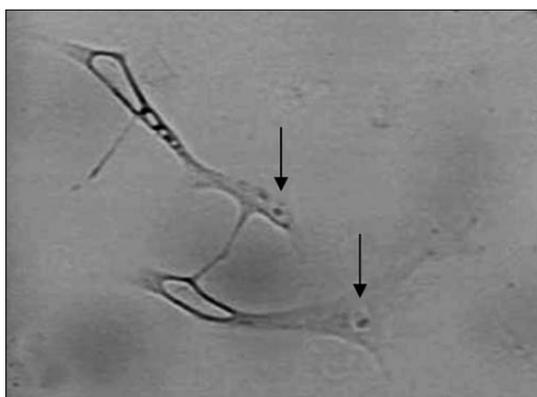
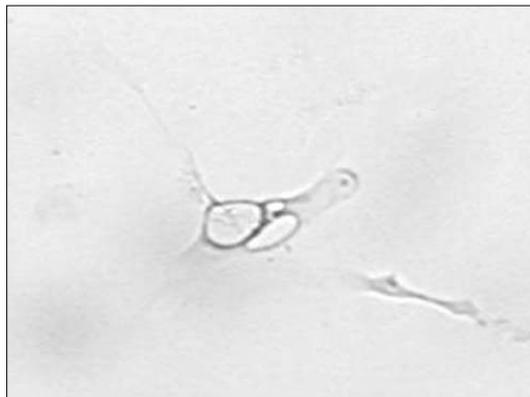


Рис. 3. Симметричная нейральная дифференцировка в клеточной линии из фолликулов волос человека. Дифференцированные сестринские клетки часто удерживаются рядом дендритоподобными выростами цитоплазмы.



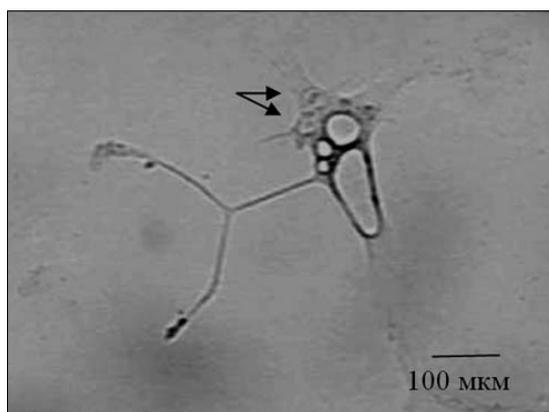
а. 0 дней



б. 1 день



в. 2 день



г. 3 день

Рис. 4. Слияние двух сестринских симметрично дифференцированных клеток из фолликулов волос человека с образованием двуядерной клетки. Две одноядерные сестринские дифференцированные клетки сохраняют связь посредством тонкого тяжа цитоплазмы (а), а затем сливаются в одну клетку с двумя ядрами (б - г), причем на третий день (г) ядра с ядрышками (светлые зоны с темными точками) находятся рядом (на снимке они расположены сверху слева от вакуолей). Стрелками указаны ядра.

Получение и анализ культуры клеток гранулезы из фолликулов яичника коров. Важнейшим ресурсом повышения эффективности производства животноводческой продукции являются технологии продукции *in vitro* эмбрионов для последующей трансплантации животным-реципиентам. Этот подход направлен на максимальное использование генетического потенциала отдельных, наиболее высокопродуктивных доноров яйцеклеток. Практическая реализация данного метода в значительной степени тормозится недостаточно высоким выходом зародышей, достигших стадии бластоцисты и пригодных для трансплантации. Для преодоления раннего блока дробления и развития эмбрионов до стадии бластоцисты представляется перспективным использование совместного культивирования зародышей с культурами соматических клеток, получаемых из репродуктивного тракта животных того же вида, что и яйцеклетки – например, клеток яйцевода, кумулюса или гранулезы, находящихся в фолликулярной жидкости, окружающей ооцит-кумуляные комплексы. «Поддерживающие» культуры могут создавать благоприятный для развития зародышей сигнально-информационный фон путем продукции ростовых факторов. Это определяет актуальность разработки методов культивирования клеток гранулезы для использования в технологии продукции эмбрионов животных.

Для получения культуры клеток гранулезы коров нами был принят модифицированный метод Langhout et al. [18]. Существенной особенностью использованного нами подхода является добавление в культуральную среду фолликулярной жидкости (стерилизованной фильтрацией через бактериальный фильтр). Этот прием был использован на основании данных швейцарского исследователя Мишеля Хорисбергера (M. Horisberger) о том, что в фолликулярной жидкости содержатся вещества, ингибирующие апоптоз и стимулирующие пролиферацию клеток [19], несмотря на то, что Хорисбергер работал с фолликулами свиней, а не крупного рогатого скота.

Культуры гранулезных клеток анализировали с помощью компьютерной видеосъемки. Было обнаружено, что добавление фолликулярной жидкости к культуральной среде

обеспечивает интенсивную пролиферацию клеток и возможность их продолжительного культивирования без признаков клеточного старения. Так, в течение первых 10 дней культивирования при добавлении к среде трети фолликулярной жидкости образовался густой клеточный монослой, а затем были получены длительно культивируемые культуры, поддерживаемые не только с помощью трипсиновых пересевов, но и менее трудоемким приемом – еженедельной сменой среды в одном и том же культуральном сосуде. В то же время без применения фолликулярной жидкости клетки сначала размножаются, но затем быстро стареют, то есть увеличиваются в размерах и прекращают делиться.

Особенно интересно, что фолликулярная жидкость оказалась эффективной не только при ее исходном добавлении в культуральную среду. Добавление одной трети фолликулярной жидкости обеспечивало ярко выраженный омолаживающий эффект на постаревшие клетки. Так, в одном из экспериментов клетки гранулезы после 13 дней культивирования без добавления фолликулярной жидкости прекратили пролиферацию и приобрели увеличенный размер и морфологию, характерную для постаревших клеток. Однако добавление среды с содержанием третьей части фолликулярной жидкости после очередных 8 дней культивирования привело к возобновлению пролиферации, и количество клеток увеличилось. На компьютерных видеозаписях было обнаружено много митотических делений, причем в деление вступали не только мелкие, но и крупные постаревшие клетки (рис. 5). В дальнейшем (наблюдение до 40 дней) в данную культуру при еженедельной смене среды добавляли 10% фолликулярной жидкости. В течение этого срока в культуре увеличивалось количество густых монослойных участков.

Таким образом, разработан способ получения долговременной культуры клеток гранулезы из фолликулов яичника крупного рогатого скота на основе использования стерилизованной фильтрацией жидкости из фолликулов яичника коров.

Изучение цитогенетических эффектов диализована на клетки линии рака легкого A549. Культуры клеток человека находят широкое применение в практике токсикологических

испытаний по выявлению способности ряда ксенобиотиков оказывать цитопатические и генотоксические эффекты. С помощью компьютерной видеомикроскопии, при условии отработанных методических приемов, можно с высокой количественной точностью изучать воздействие химических веществ на пролиферацию, апоптоз, дифференцировку

и характер локомоторной активности клеток. Все эти характеристики связаны с рядом важных физиологических процессов. Например, локомоторная активность важна в иммунном ответе, карциногенезе и метастазировании, заживлении ран и тканевой регенерации, а также в ряде процессов, происходящих при индивидуальном развитии организма.

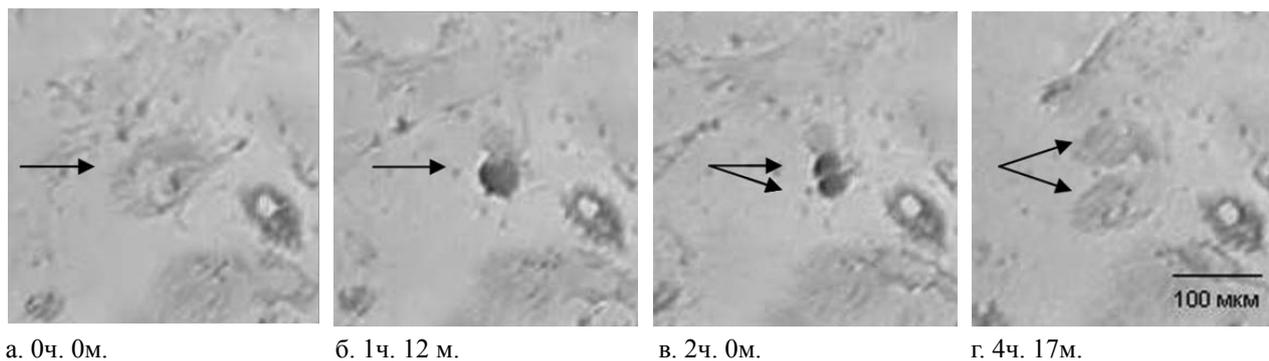


Рис. 5. Митотическое деление крупной постаревшей клетки гранулезы из фолликулов яичника коров после добавления третьей части фолликулярной жидкости к культуральной среде. Клетка в центре (а) принимает шаровидную форму (б) и делится на две дочерние клетки (в), которые затем распластаются на ростовом субстрате (г). Соседняя (справа) крупная клетка с высокой оптической плотностью не перемещается, не меняет форму и является погибшей. Стрелками указаны материнская и сестринские клетки.

Прижизненный анализ клеточных популяций может быть высокоэффективным подходом в токсикологическом и фармакологическом тестировании. Так, с помощью разработанной нами методики витального анализа клеток были исследованы эффекты 24-эпибрассинолида на пролиферацию эмбриональных фибробластов человека и мыши [20].

С помощью компьютерной видеомикроскопии мы обнаружили, что в изучении иммортализованной линии из эмбриона мыши мы обнаружили процесс клазматоза – отделения безъядерных фрагментов цитоплазмы [7-8]. Этот процесс происходил регулярно и при анализе разреженных клеточных культур регистрировался почти в каждом межмитотическом интервале. Функциональное значение клазматоза неизвестно. Выдвинуто предположение о том, что отделение участков цитоплазмы может быть механизмом регуляции клеточного объема и эвакуации шлаков [7].

Полученные нами результаты изучения клазматоза в клеточных культурах позво-

лили обратить особое внимание на один из эффектов, вызываемых антиопухолевым агентом диазиквоном на клетки линии рака легкого A549 (рис. 6). Было обнаружено, что диазиквон в концентрации 1 мкг/мл при воздействии течение 2 суток резко увеличивает долю клеток, находящихся в процессе клазматоза. После двухдневного воздействия на клеточную культуру диазиквон в концентрации 0,1 мкг/мл в 7 раз повышал уровень микроядер и в 11 раз – число клеток на стадии клазматоза, а в концентрации 1 мг/мл происходило только резкое увеличение доли клазматозных клеток (в 70 раз). Следовательно, количественный учет клазматоза может применяться в токсикологическом тестировании на клеточных культурах.

Перспективы использования компьютерной видеомикроскопии живых клеток в фундаментальных и прикладных исследованиях во многом определяются все более полной автоматизацией как процесса компьютерной видеозаписи, так и обработки компьютерных имиджей [21].

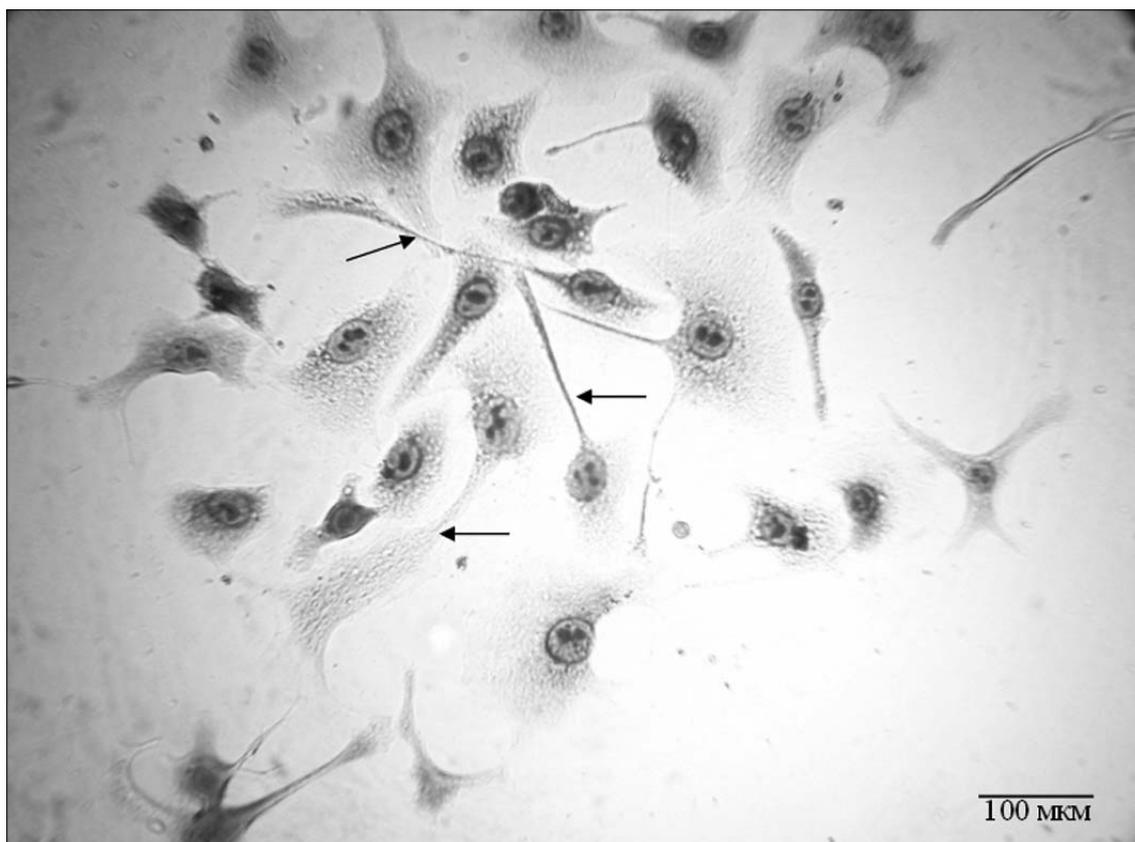


Рис. 6. Диазиквон в концентрации 1 мкг/мл при воздействии на клеточную культуру линии A549 в течение 2 суток резко увеличивает долю клеток, находящихся в процессе клазматоза – отделения фрагментов цитоплазмы. Стрелками указаны отделяющиеся от клеток удлинненные выросты цитоплазмы.

Список использованных источников

1. Hayflick L., Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell. Res.* – 1961. – Vol. 25. – P. 177-185.
2. Bayreuther K., Franz P.I., Gogol J., Napke C., Maier M., Meinrath H.G. Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems// *Mutation Research.* – 1991. – Vol. 256, № 2-6. – P. 233-242.
3. Шейко Я.И., Квитко О.В., Конева И.И., Тюриков А.П. // Доклады НАН Беларуси. – 2002. – Т. 46, – № 1. – С. 90-94.
4. Simons, J.W. Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis // *Critical Reviews in Oncogenesis.* – 1995. – Vol. 6, № 3-6. – P. 261-273.
5. Квитко О.В., Шейко Я.И., Конева И.И., Мезен Н.И., Тюриков А.П. Исследование причин различной предрасположенности к раковой трансформации клеток человека и мыши // *Известия НАН Беларуси, сер. биол. наук.* – 2002, № 2. – С. 61-64.
6. Sundaram M., Guernsey D.L., Rajaraman M.M., Rajaraman R. Neosis: a novel type of cell division in cancer // *Cancer Biol. Ther.* – 2004. – Vol. 3. – № 2. – P. 207-218.
7. Квитко О.В., Шейко Я.И., Конева И.И. Анализ неограниченной пролиферации иммортализованной линии клеток с помощью прижизненной микроскопии. // Доклады НАН Беларуси. – 2005. – Т. 49, № 5. – С. 89-93.
8. Kvitko O.V., Koneva I.I., Sheiko Y.I., Anisovich M.V. Hunting the mechanisms of self-renewal of immortal cell populations by means of real-time imaging of living cells // *Cell Biology International.* – 2005. – Vol. 29. – P. 1019-1024.
9. G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Lin-skens M.,

- Rubelj I., Pereira-Smith O. e.a. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 9363-9367.
9. Квитко О.В., Шейко Я.И., Конева И.И., Анисович М.В. Активность бета-галактозидазы в стареющей и иммортализованной клеточных популяциях // Известия НАН Беларуси, сер. биол. наук. – 2006, № 4. – С. 53-57.
10. Квитко О.В., Шейко Я.И., Конева И.И., Дромашко С.Е. Разработка клеточных тест-систем для создания полинуклеотидных антираковых препаратов // Молекулярная и прикладная генетика. – 2008. – Т. 7. – С. 18-24.
11. Квитко О.В., Жукова Л.Н., Конева И.И. Антираковый эффект экзогенных нуклеиновых кислот // Доклады АН Беларуси. – 1992. – Т. 36, № 7-8. – С. 652-655.
12. Hong Yu, Dong Fang, Kumar S.M., Ling Li, Nguyen T.K., Acs G., Herlyn M., Xiaowei Xu. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles // American Journal of Pathology. – 2006. – Vol. 168. – P. 1879-1888.
13. Gho C.G., Braun J.E., Tilli C.M., Neumann H.A., Ramaekers F.C. Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell culture // Br. J. Dermatol. – 2004. – Vol. 150. – P. 860-868.
14. Cremisi C., Duprey P. Spontaneous differentiation of murine teratocarcinoma stem cells at low temperature // J. Cell Physiol. – 1986. – Vol. 129. – P. 230-236.
15. Kumar N., Gammell P., Meleady P., Henry M., Clynes M. Differential protein expression following low temperature culture of suspension CHO-K1 cells // BMC Biotechnol. – 2008. – Vol. 8. – P. 42.
16. Zwaka T.P., Thomson J.A. Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division // Stem Cells. – 2005. – Vol. 23. – P. 146-149.
17. Langhout D.J., Spice L.J., Geisert R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis // J. Anim. Sci. – 1991. – Vol. 6. – P. 3321-3334.
18. Horisberger M. A method for prolonged survival of primary cell lines // In Vitro Cellular and Developmental Biology. – 2006. – Vol. 42, № 5-6. – P. 143-148.
19. Конева И.И., Войтович А.М., Наджарян Л.А., Афонин В.Ю., Котеленец А.И., Квитко О.В. Эпибрассинолид модифицирует пролиферацию и апоптоз эмбриональных фибробластов // Новости медико-биологических наук. – 2005. – № 2. – С. 112-117.
20. Bahnson A., Athanassiou C., Koebler D., Shun T., Shields D., Yu H., Wang H., Goff J., Cheng T., Houck R., Cowser L. Automated measurement of cell motility and proliferation // BMC Cell Biol. – 2005. – Vol. 6. – P. 19.

Дата поступления статьи 10 апреля 2009 г.

Н.И. Рябоконт, Н.В. Никитченко, Р.И. Гончарова

СТИМУЛЯЦИЯ РЕПАРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОГО ИЗ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНА

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Известно, что препараты из серии 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) характеризуются широким разнообразием химических структур, биологических активностей и, соответственно этому, широким диапазоном фармакологических свойств, включая кардиоваскулярные, нейромодуляторные, кортикостероидные, антидиабетические, антинеопластические, противовоспалительные, геропротекторные, радиопротекторные и т.д. [1-9]. Показана низкая токсичность препаратов этой серии для клеток человека [10, 11], а также для модельных видов животных [2]. Биобезопасность 1,4-ДГП-ов позволяет отнести их к фармакологической группе «зеленая химия» [12]. Поэтому представляет интерес поиск новых фармакологических свойств препаратов из этой серии, а также синтез новых производных 1,4-ДГП с заранее установленными свойствами. Коллективом нашей лаборатории показано, что некоторые химические соединения этой серии, главным образом принадлежащие к группе β -карбонил-1,4-ДГП, обладают антимуtagenными свойствами, снижая уровень спонтанных, химически- и радиационно-индуцированных мутаций у модельных видов животных [13-16]. Установлено также, что одним из механизмов действия этих препаратов является модулирование эксцизионной репарации ДНК [14, 17]. При дальнейшем

изучении механизмов действия обнаружено, что 1,4-ДГП-ы могут стимулировать синтез поли(ADP-рибозы), участвующей в репарации ДНК, и тем самым увеличивать скорость и эффективность эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках человека [18]. Высокая эффективность 1,4-ДГП-ов в стимуляции репарации повреждений ДНК показана на культуре опухолевых клеток человека после различных типов генотоксического воздействия, а также на лимфоцитах, изолированных из периферической крови одного донора и подвергнутых далее гамма-облучению или обработке этилметансульфонатом [10, 18]. Большой теоретический и практический интерес представляет выяснение особенностей защитного действия соединений данной серии против окислительных повреждений в геноме людей, поскольку установлено большое значение окислительных повреждений в патогенезе различных заболеваний, в том числе онкологических, аутоиммунных и обусловленных старением. Для выяснения эффектов одного из перспективных препаратов из серии 1,4-ДГП на репарацию окислительных повреждений ДНК в соматических клетках человека были проведены исследования *in vitro* на лимфоцитах, полученных из венозной крови нескольких доноров. Результаты этих исследований представлены в данной работе.

Материалы и методы

Исследуемый препарат синтезирован в Латвийском институте органического синтеза. Стоковые растворы препарата были при-

готовлены на питательной среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) и хранились при 4°C.

Лимфоциты периферической крови вы-

делены из венозной крови от 5 доноров-добровольцев женского пола в возрасте до 45 лет без видимых симптоматических заболеваний. Для выделения использован градиент плотности в растворе Histopaque-1077 (ICN).

Обработка клеток 50-1500 мкМ раствором пероксида водорода (H_2O_2) проведена при 4°C в течение 1 мин. Для предотвращения репарации ДНК процедура отмывки клеток от пероксида также проведена при 4°C с использованием охлажденного PBS и центрифуги с рефрижератором.

Постобработка клеток исследуемым препаратом осуществлена сразу после отмывки от пероксида водорода. Для старта репарационного процесса лимфоциты были помещены в инкубатор при 37°C и 5% CO_2 , в полноценную питательную среду (RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки и L-глутамин). К среде был добавлен исследуемый препарат в различных концентрациях. При длительной 24-48 ч инкубации в питательную среду дополнительно вносили 0,1% гентамицин.

Оценка выживаемости лимфоцитов после обработки пероксидом водорода выполнена через 24 и 48 ч инкубации в 96-луночных планшетах в присутствии различных концентраций препарата. Использовали цитоплазматический краситель трипановый синий, добавленным к образцам клеток, согласно протокола производителя (Sigma-Aldrich). Подсчет количества мертвых и живых клеток выполнен в камере Бюркера под микроскопом при 100-120 кратном увеличении.

Для оценки повреждений ДНК и их репарации был использован щелочной гель-электрофорез одиночных клеток, или метод ДНК-комет (комет-оценки, Comet assay) [19, 20]. Отбор проб лимфоцитов выполнен на 0, 15, 30, 60, 120 и 180 мин восстановления клеток после обработки пероксидом водоро-

да. Анализ 100 клеток на образец проведен с использованием флуоресцентного микроскопа фирмы Leica DMRXA2 при 400-кратном увеличении и классификации комет, согласно стандартам, разработанным А. Collins с соавторами [21]. При этом для измерения уровня повреждений ДНК служили условные единицы (усл. ед.), или arbitrary units (a.u.). Более подробный протокол комет-оценки представлен в работе [10]. Кинетика репарации ДНК оценена с использованием показательной функции:

$$y(t) = a \times \exp^{(-t/b)} + c, \quad (1)$$

где y – количество повреждений в момент t , a – репарируемая фракция повреждений ДНК, t – время, b – постоянная времени, характеризующая скорость репарации ДНК и c – нерепарируемая фракция повреждений ДНК. Описание репарации ДНК в лимфоцитах здоровых доноров и онкологических больных с использованием данной функции дано в работе [22]. В дальнейшем эта функция была также применена и для оценки репарации в культуре опухолевых линий клеток человека [10] и для расчета $T_{1/2}$ – времени, необходимого для репарации 50% повреждений ДНК [18].

Статистический анализ данных выполнен в пакете прикладных программ STATISTICA (Statsoft Inc., USA) с использованием t -критерия Стьюдента и регрессионного анализа. В среднем каждый эксперимент имел 2 повторности. Эффективность генопротекторной активности исследуемого препарата оценивали по формуле:

$$RF = ((DD_0 - DD_c) / DD_0) \times 100 (\%), \quad (2)$$

где RF – эффективность (reduction factor) препарата, выраженная в процентах, DD_0 – регистрируемый уровень повреждения ДНК после обработки пероксидом водорода и DD_c – уровень повреждений ДНК после инкубации клеток в присутствии исследуемого препарата.

Результаты и обсуждение

Влияние исследуемого препарата на кинетику репарации окислительных повреждений ДНК в лимфоцитах человека. В первой серии экспериментов нами были изучены генотоксические эффекты различных концентраций пероксида водорода при кратков-

ременной обработке лимфоцитов человека *in vitro*. Установлено, что индукция повреждений ДНК в лимфоцитах человека кратковременным окислительным стрессом вследствие использования пероксида водорода в диапазоне концентраций от 50 до 1000 мкМ подчиняется

логарифмической функции (рис. 1, верхняя линия регрессии). При более высокой концентрации пероксида водорода, равной 1500 мкМ, происходит необратимое повреждение ДНК и гибель клеток. Установленная логарифмическая форма зависимости «концентрация-эффект» для повреждений ДНК в первые минуты после обработки пероксидом водорода в концентрации 50-1000 мкМ сохраняется и после 3 часов репарации ДНК (рис. 1, нижняя линия регрессии). Однако лишь при концентрациях пероксида до 100 мкМ включительно количество повреждений ДНК приближается к исходному (фоновому) уровню после 3 часов восстановления клеток, т.е. в течение времени, которое считается достаточным для завершения эксцизионной репарации оснований ДНК (base excision repair – BER). При более высоких концентрациях пероксида, сохраняются клетки с более высоким и нерепарируемым уровнем повреждений ДНК. Поэтому в последующей серии экспериментов по оценке влияния исследуемого препарата на кинетику репарации окислительных повреждений ДНК мы использовали концентрацию пероксида водорода, равную 100 мкМ, которая индуцирует репарируемые уровни повреждений ДНК.

Кинетика репарации окислительных повреждений ДНК (рис. 2), как и ожидалось, описывалась показательной функцией (функция 1). Наибольшее количество повреждений ДНК репарировалось в первые 15 мин восстановления клеток от окислительного стресса. Исследуемый препарат существенно снижал уровень повреждений ДНК с первых 15 мин и на протяжении последующих 3 часов репарации ДНК (рис. 2). При этом под влиянием препарата после 3-х часовой инкубации клеток зарегистрировано снижение индуцированных повреждений ДНК ниже контрольного уровня. Средняя эффективность генопротекторного действия препарата в этот период времени составила 50%. Аналогичные данные о влиянии 1,4-ДГП-ов на кинетику репарации ДНК получены нами ранее для опухолевых клеток при различных типах генотоксического воздействия, включая окислительный стресс [10, 18], а также для лимфоцитов человека после гамма-облучения или обработки этилметансульфонатом [10].

Проведенный расчет $T^{1/2}$ показал, что для репарации 50% повреждений ДНК, индуцированных 100 мкМ пероксида водорода в лимфоцитах здоровых доноров, необходимо

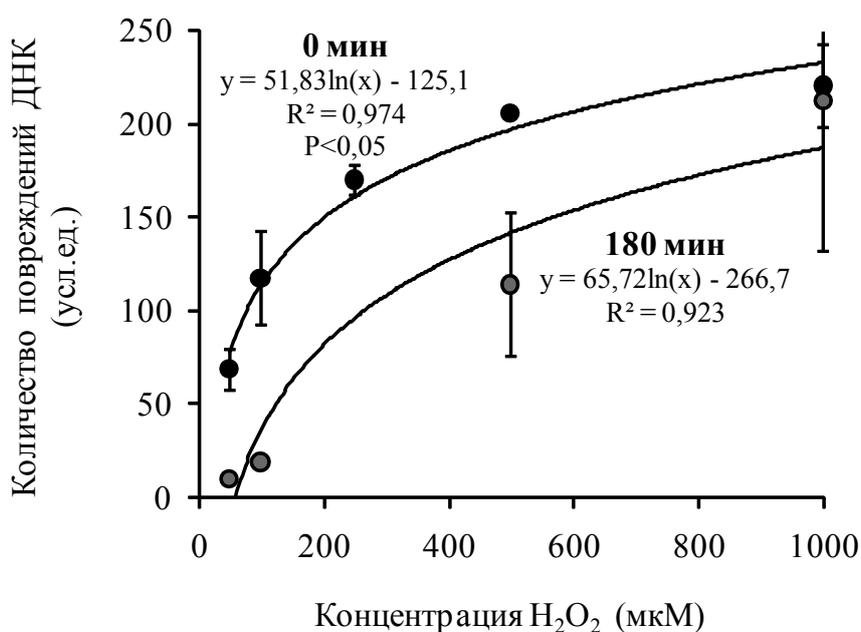


Рис. 1. Зависимость концентрация-эффект для повреждений ДНК, регистрируемых на 0 и 180 мин после окислительного стресса, индуцированного различными концентрациями пероксида водорода в лимфоцитах здоровых доноров *in vitro*.

10,16±0,99 мин. Использование препарата, существенно ($P<0,05$) увеличивает скорость

репарации на 30%, снижая показатель $T^{1/2}$ до 6,87±0,79 мин.

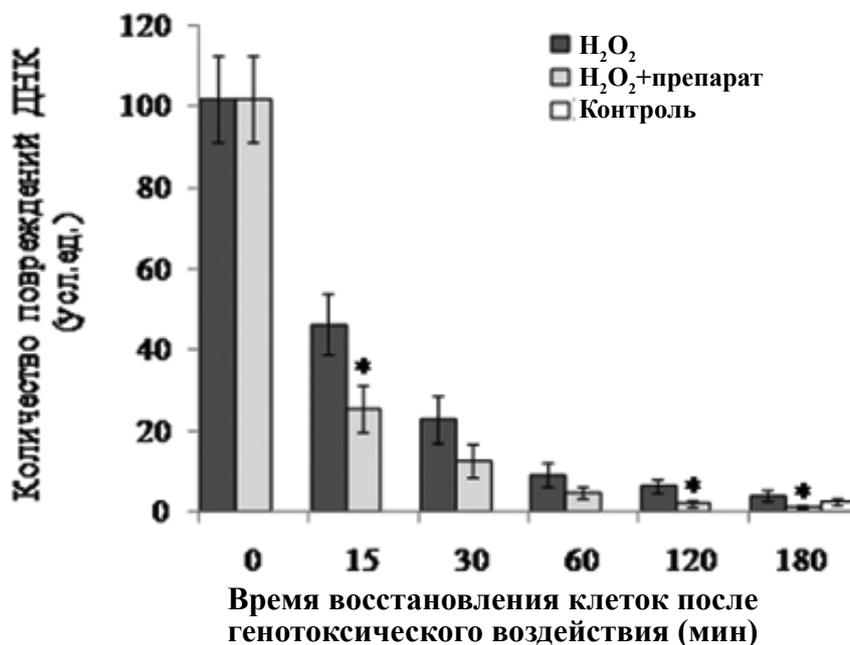


Рис. 2. Влияние 10^{-9} М исследуемого препарата на кинетику репарации повреждений ДНК, индуцированных в лимфоцитах здоровых доноров *in vitro* однократной обработкой пероксидом водорода.

Представлены средние данные ± стандартные отклонения.

* - $P<0,05$ по сравнению с индуцированным уровнем повреждений ДНК.

Влияние исследуемого препарата на выживаемость лимфоцитов, подвергнутых окислительному стрессу. В третьей серии экспериментов изучалось влияние препарата на выживаемость лимфоцитов человека после кратковременной обработки *in vitro* пероксидом водорода. Установлено, что постобработка лимфоцитов исследуемым препаратом в широком диапазоне низких концентрации (от 10^{-10} до 10^{-5} М) повышает выживаемость лимфоцитов, подвергнутых воздействию окислительного стресса. Повышенная выживаемость клеток в присутствии препарата наблюдается как на 24 ч, так и в более поздний период – на 48 ч восстановления клеток от окислительного стресса (рис. 3). Максимальное увеличение

выживаемости клеток составляет 30% при концентрациях препарата 10^{-9} и 10^{-7} М и при среднем уровне окислительного стресса (500 мкМ H_2O_2). При более высоких уровнях генотоксического воздействия, по-видимому, оказываются эффективнее более высокие концентрации препарата (рис. 3).

Ранее было показано, что 1,4-ДГП-ы в широком диапазоне концентраций не являются токсичными для клеток человека и не влияют на их выживаемость в нормальных условиях [10, 11]. Следовательно в дополнение к ранее полученным данным результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что препараты из группы 1,4-ДГП-ов могут повышать выживаемость клеток при генотоксическом (окислительном) стрессе.

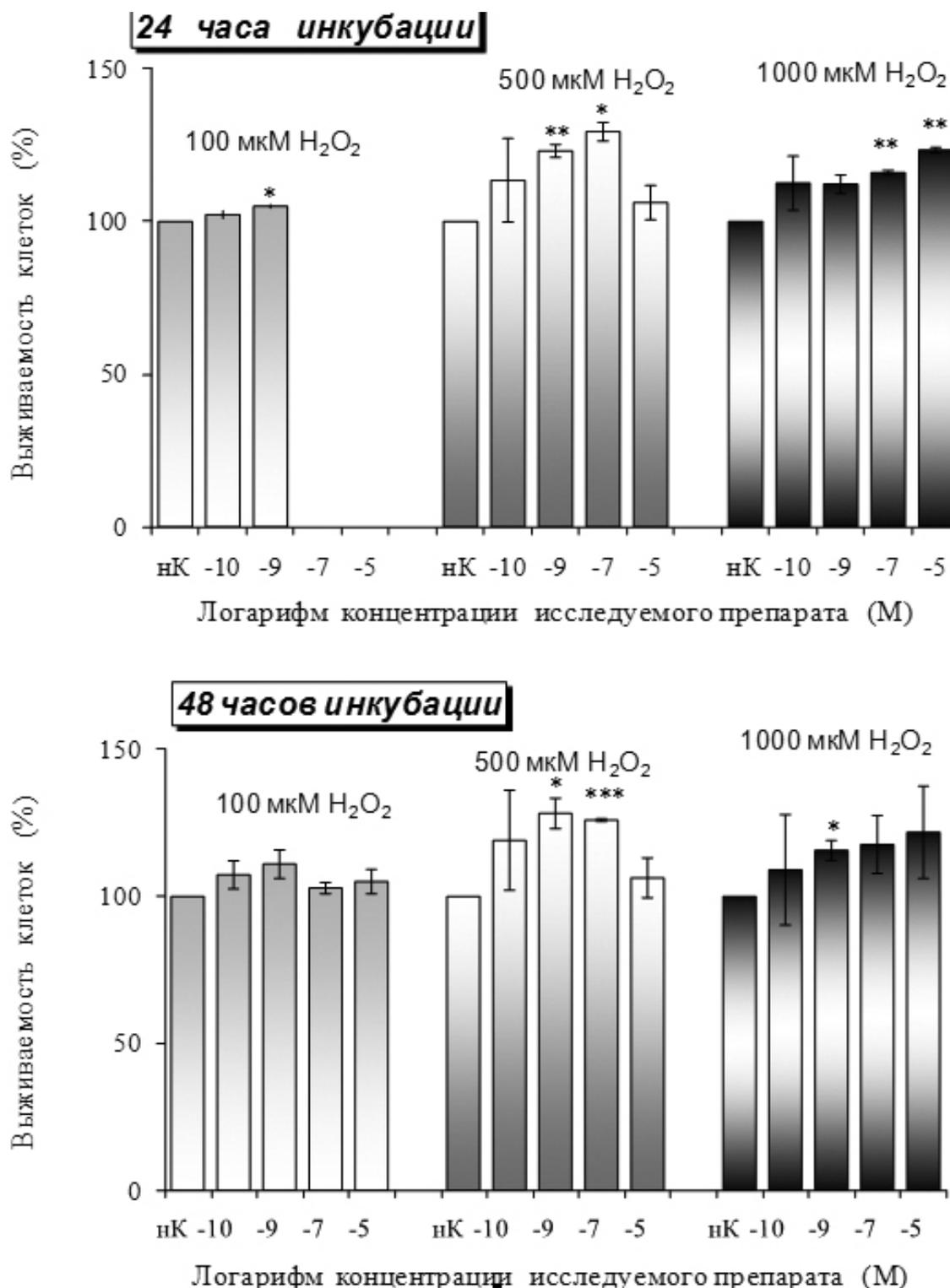


Рис. 3. Влияние исследуемого препарата на выживаемость лимфоцитов человека после обработки различными дозами пероксида водорода. Анализ выживаемости проведен на 24 и 48 ч инкубации клеток в присутствии различных концентраций препарата. Представлены средние данные \pm стандартные отклонения.

* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$ и *** - $P < 0,001$ по сравнению с негативным контролем (нК).

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что перспективный препарат из серии 1,4-ДГП-ов существенно влияет на репарацию повреждений ДНК, индуцированных окислительным стрессом в клетках здоровых доноров. Установлено также, что репарогенная активность препарата против окислительных повреждений ДНК сопровождается повышением на 30% выживаемости исследуемых клеток. Обнаруженная способность антимутагена из серии 1,4-ДГП-ов защищать геном клеток человека и повышать их выживаемость при окислительном стрессе имеет важное прак-

тическое значение, поскольку окислительный стресс играет решающую роль в этиологии и патогенезе многих заболеваний, в том числе онкологических, аутоиммунных и обусловленных старением.

Представленная работа выполнена в рамках научно-технического задания, финансируемого Государственной комплексной программой научных исследований «Биологическая инженерия и биобезопасность», а также в рамках международного сотрудничества между Институтом генетики и цитологии НАНБ и Латвийским институтом органического синтеза (г. Рига, Латвия).

Список использованных источников

1. Effect of cerebrocrast on the function of human platelets and release of the arachi-donic acid from plasma membrane / J. Briede [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 2002. – Vol. 20 – P. 177-181.
2. «Atypical» neuromadulatory profile of glutapyrone, a representative of a novel 'class' of amino acid-containing dipeptide-mimicking 1,4-dihydropyridine (DHP) compounds: in vitro and in vivo studies / I. Misane [et al.] // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 1998. – Vol. 8. – P. 329-347.
3. Influence of different types of the 1,4-dihydropyridine derivatives on rat plasma corticosterone levels / E. Liutkevičius [et al.] // *Biomedical Letters.* – 1999. – Vol. 60. – P. 39-46.
4. Effect of some 1,4-dihydropyridine Ca antagonists on the blast transformation of rat spleen lymphocytes / J. Briede [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 1999. – Vol. 17. – P. 97-105.
5. Effect of cerebrocrast on the lymphocyte blast transformation activity in normal and streptozotocin-induced diabetic rats / J. Briede [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 1999. – Vol. 17. – P. 89-96.
6. Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells / A. Klegeris [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 441. – P. 203-208.
7. Геропротекторная активность 2,6-диметил-3,5-диоксикарбонил-1,4-дигидропиридина / Н.М. Эмануэль [и др.] // *Докл. Акад. Наук СССР.* – 1998. – Т. 284. – С. 1271-1274.
8. Антинеопластический эффект глута- пирона при хроническом гамма-облучении крыс / Л.П. Ваританян [и др.] // *Радиационная Биология. Радиоэкология.* – 2004. – Т. 44. – № 2. – С. 198-201.
9. Радиомодифицирующие свойства производных 1,4-дигидропиридина и 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-декагидроакридин-1,8-диона / Е.В. Иванов [и др.] // *Радиационная Биология. Радиоэкология.* – 2004. – Т. 44. – № 5. – С. 550-559.
10. 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulate DNA repair in human cells in vitro / N.I. Ryabokon [et al.] // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 587. – P. 52-58.
11. Результаты исследований генопротекторной активности одного из перспективных производных 1,4-дигидропиридина с использованием клеток человека in vitro / Н.И. Рябоконт [и др.] // *Сборник трудов «Молекулярные методы в генетике человека»*, Минск, ИГЦ НАНБ, 2008. – С. 105-109.
12. Dihydropyridine derivatives as bioprotectors / G. Duburs [et al.] // *Chemistry Today.* – 2008. – Vol. 26. – P. 68-70.
13. Сравнительное изучение антимутагенного действия соединений дигидропиридинового ряда в связи с их антиоксидантной активностью / Р.И. Гончарова [и др.] // *Докл. АН СССР.* – 1980. – Т. 225. – № 6. – С. 1483-1486.
14. Кужир, Т.Д. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот / Е.Д. Кужир. – Минск, 1999. – 267 с.
15. Anticlastogenicity of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid in mouse mi-

cronucleus test / R.I. Goncharova [et al.] // *Mutat. Res.* – 2001. – V. 496. – P. 129-135.

16. Promising antimutagen for improving reproductive indices of stripped fishes and the quality of their progeny / R. Goncharova [et al.] // *EAS Special Publication.* – 2002. – №.31. – P. 63-70.

17. Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты / О. Даливеля [и др.] // *Цитология и генетика.* – 2005. – Т. 39. – № 5. – С. 62-72.

18. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining / N.I. Ryabokon [et al.] // *Mutat. Res.* – 2008. – V. 637. – № 1-2. – P. 173-181.

19. UV-C sensitivity of unstimulated and

stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique / M.H.L. Green [et al.] // *Mutat. Res.* – 1992. – Vol. 273. – P. 137-144.

20. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing / R.R. Tice [et al.] // *Environ. Mol. Mutagenesis.* – 2000. – Vol. 35. – P. 206-221.

21. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA / A. Collins [et al.] // *Carcinogenesis.* – 1993. – Vol. 14. – P. 1733-1735.

22. Radiation-induced DNA damage and its repair in lymphocytes of patients with head and neck cancer and healthy donors / O. Palyvoda [et al.] // *Anticancer Res.* – 2002. – Vol. 22. – P. 1721-1726.

Дата поступления статьи 10 мая 2009 г.

Н.В. Савина¹, М.П. Смаль¹, Т.Д. Кужир¹, А.А. Ершова-Павлова², Н.П. Кудрейко³, И.Г. Першин³,
В.С. Савочкин⁴, Л.П. Юревич⁴, Р.И. Гончарова¹

МЕТОД ДНК-КОМЕТ В ВЫЯВЛЕНИИ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ. МОНИТОРИНГ СОСТОЯНИЯ ГЕНОМА У РАБОТНИКОВ ОАО «МАЗ»

¹ ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск 220072, Академическая, 27,

² РНПЦ «Мать и дитя», 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66,

³ Центр гигиены и эпидемиологии Заводского района г. Минска, 220026, г. Минск, ул. Плеханова, 18,

⁴ Медсанчасть ОАО «МАЗ», 220021, г. Минск, ул. Социалистическая, 10

Введение

Загрязнение окружающей среды мутагенными факторами способствует накоплению мутационного груза и развитию индуцированной геномной нестабильности, что в первую очередь доказано на группах населения, а также популяциях животных, подвергшихся хроническому воздействию малых доз ионизирующего излучения вследствие Чернобыльской катастрофы [1, 2]. Экспериментально установлено, что геномная нестабильность возникает как под влиянием радиации, так и химических мутагенов, способствуя в том и другом случае малигнизации клеток [3-5]. Установлена также связь повышенной заболеваемости с трансгенерационной геномной нестабильностью, по крайней мере, у детей, родители которых участвовали в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС или проживали на загрязненных территориях [6]. Актуальность изучения этого явления в различных группах населения Беларуси обсуждалась нами ранее [7, 8]. Она обусловлена неблагоприятной экологической обстановкой и заметным ростом уровня мутабельности соматических клеток у жителей наиболее загрязненных районов и крупных промышленных городов. Выявление геномной нестабильности будет способствовать формированию групп риска по заболеваемости и организации адресной профилактической и медицинской помощи.

В рамках выполнения задания 4.7.6 ГП Биотехнология (Раздел ДНК-технологии для сельского хозяйства и здравоохранения) в лаборатории генетической безопасности Ин-

ститута генетики и цитологии НАН Беларуси разрабатывается технология диагностики геномной нестабильности с помощью метода ДНК-комет. Первоначально проанализирован статус генома в контрольной группе клинически здоровых доноров-волонтеров, что позволило оценить такие средне-популяционные показатели, как фоновый уровень молекулярных повреждений ДНК, чувствительность генома к окислительному стрессу и эффективность репарации ДНК, характеризующие стабильное состояние генома у представителей населения Беларуси [7, 8]. Апробация этой технологии в РНПЦ «Мать и дитя» показала ее эффективность для диагностики геномной нестабильности в группах пациентов с предполагаемым диагнозом синдрома хромосомной нестабильности (СХН) и множественными врожденными пороками развития (МВПР), в частности, у детей с синдромом Вильямса [9].

В настоящее время апробация технологии диагностики геномной нестабильности с помощью метода ДНК-комет проводится у лиц, занятых на производстве. Конечной целью исследования является анализ статуса генома в группах лиц, работающих в разных условиях труда, для того, чтобы установить возможную зависимость нарушений генома от комплекса вредных факторов производственной среды, а также выявить индивидуальные особенности генома, позволяющие оценить риск заболеваемости в связи (или без таковой) с производственной деятельностью человека.

Материалы и методы

Работа проводится на базе медико-санитарной части ОАО «МАЗ» при содействии Центра гигиены и эпидемиологии Заводского района г. Минска.

На первом этапе исследования разработана документация, включающая: 1) памятку для добровольного участника, разъясняющую его права и цели исследования, 2) информированное согласие, 3) анкету участника, 4) инструкцию для медперсонала по отбору и хранению образцов периферической венозной крови.

Анкета участника содержит сведения о возрасте, адресе проживания, месте и стаже работы, вредных условиях труда, вредных привычках, перенесенных заболеваниях, приеме лекарств, рентгенологическом обследовании и некоторые другие. Конфиденциальность этих сведений гарантируется.

Вторым этапом работы является формирование групп обследования:

- группы сравнения или внутреннего контроля из числа лиц, работающих на предприятии, но непосредственно не контактирующих с мутагенными факторами производственной среды;
- группы риска из числа лиц, по роду профессиональной деятельности подвергающихся воздействию комплекса химических загрязнителей или других мутагенных факторов производственной среды.

Участниками исследования являются добровольцы, обращающиеся в медсанчасть для прохождения профилактического осмотра. В данной публикации представлены результаты обследования 30-ти человек из группы сравнения (21 женщина, 9 мужчин). От каждого из них получено подписанное информированное согласие. Профессиональный состав: медицинский, научно-технический и обслуживающий персонал. Возраст обследуемых (от 23 до 62 лет) в среднем составляет 42 года. Все участники не контактировали с химическими агентами или другими мутагенными факторами.

Забор периферической венозной крови осуществлялся специалистами медсанчасти. Образцы цельной крови в количестве 5 мл отбирали в стерильные вакутайнеры с гепарином и хранили в холодильнике при 4°C не более 2–3-х часов. *Объект исследования* – изолированные лимфоциты. Фракцию лимфоцитов выделяли из цельной крови центрифугированием в градиенте Histopaque-1077 (ICN) в течение 30 минут. Затем лимфоциты отмывали и инкубировали при 37°C в среде RPMI-1640 с добавлением инактивированной телячьей сыворотки (10%) в течение 3-х часов. В качестве *модельного мутагена*, индуцирующего окислительный стресс, использовали пероксид водорода (H₂O₂) в концентрации 100 мкМ, которую получали разведением 3% раствора H₂O₂ в PBS (pH 7.4). Обработку клеток проводили при 4°C, в течение 1 минуты, после чего клетки отмывали от мутагена охлажденным буферным раствором.

Выживаемость лимфоцитов определяли методом прижизненной окраски клеток трипановым синим. Анализ проводили под микроскопом с использованием камеры Бюркера, при этом учитывали соотношение мертвых (округлые клетки без видимого повреждения мембраны, окрашенные в голубой цвет) и живых клеток.

Для выявления *повреждений ДНК* использовали метод щелочного гель-электрофореза единичных клеток (метод ДНК-комет, щелочная версия) [10, 11], который включал следующие этапы: 1) приготовление микропрепаратов в агарозном геле, 2) лизис клеток для очистки ДНК; 3) щелочная денатурация при pH > 13; 4) электрофорез в горизонтальной камере, вызывающий миграцию фрагментов ДНК в электрическом поле с образованием «кометы»; 5) нейтрализация препаратов; 6) окрашивание препаратов бромистым этидием и их анализ с помощью флуоресцентного микроскопа. Изображение «комет» представлено на рисунке 1.

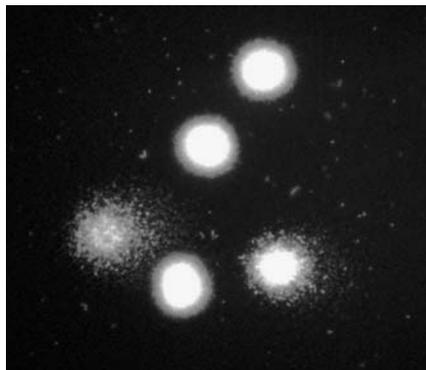


Рис. 1. Лимфоциты периферической крови здоровых доноров после обработки *in vitro* перекисью водорода.

Для изучения *репарации ДНК* проводили отбор проб на 0, 30, 60, и 180-й минуте после обработки лимфоцитов пероксидом водорода. *Эффективность репарации ДНК* рассчитывали по проценту элиминированных повреждений ДНК в каждой точке анализа относительно 0-й точки. Все процедуры, условия их проведения, параметры визуальной оценки

степени повреждения ДНК и эффективности репарации ДНК подробно описаны ранее [7, 8]. *Статистический анализ* полученных данных проводили с использованием стандартных средств Microsoft Office (Excel-2000). Выполнен корреляционный анализ. Различия между показателями оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Начато исследование статуса генома в группе сравнения, обследовано 30 человек. Анализ выживаемости лимфоцитов *in vitro* показал, что частота мертвых клеток составляет в среднем $2,69 \pm 0,35$ (спонтанная) и $2,43 \pm 0,23$ (под влиянием H_2O_2), т.е. не превышает ранее установленных значений [7, 8]. С помощью метода ДНК-комет проанализированы сле-

дующие показатели: частота эндогенных повреждений ДНК, которая отражает фоновый уровень повреждений; частота повреждений ДНК, индуцированных окислительным стрессом ($100 \mu\text{M } H_2O_2$); эффективность репарации ДНК в течение 180 мин после окислительного стресса. Средние показатели в этой выборке представлены в таблице.

Таблица

Анализ статуса генома у работников ОАО «МАЗ», не контактирующих с мутагенными факторами производственной среды

Выборка (чел)	Средний возраст	Частота эндогенных повреждений ДНК, а.у.	Частота индуцированных повреждений ДНК, а.у.		Эффективность репарации ДНК, %	
			0 мин	180 мин	30 мин	180 мин
30	42	$6,8 \pm 1,1$	$80,0 \pm 4,2$	$9,9 \pm 1,1$	$68,4 \pm 2,1$	$88,0 \pm 1,0$

Результаты настоящего анализа в целом не отличаются от показателей, зарегистрированных ранее в группе клинически здоровых доноров-волонтеров [7, 8]. Отдельные показатели (частота

эндогенных повреждений и остаточный уровень индуцированных окислительным стрессом повреждений ДНК) несколько ниже, чем в контрольной группе, однако они не выходят за

пределы, характеризующие индивидуальные особенности генома у представителей здорового населения [8]. Это показывает, что отбор лиц для обследования произведен правильно, и данная группа, действительно, может служить внутренним контролем для сравнения с группой работников предприятия, подвергающихся воздействию комплекса химических загрязнителей производственной среды.

Использованный в данной работе индивидуальный подход позволил провести корреляционный анализ для установления возможной связи уровня эндогенных и индуцированных повреждений ДНК с возрастом участников исследования, а также для сравнения остаточного уровня индуцированных повреждений ДНК с эффективностью репарации ДНК. Результаты представлены на рисунках 2 (а, б) и 3.

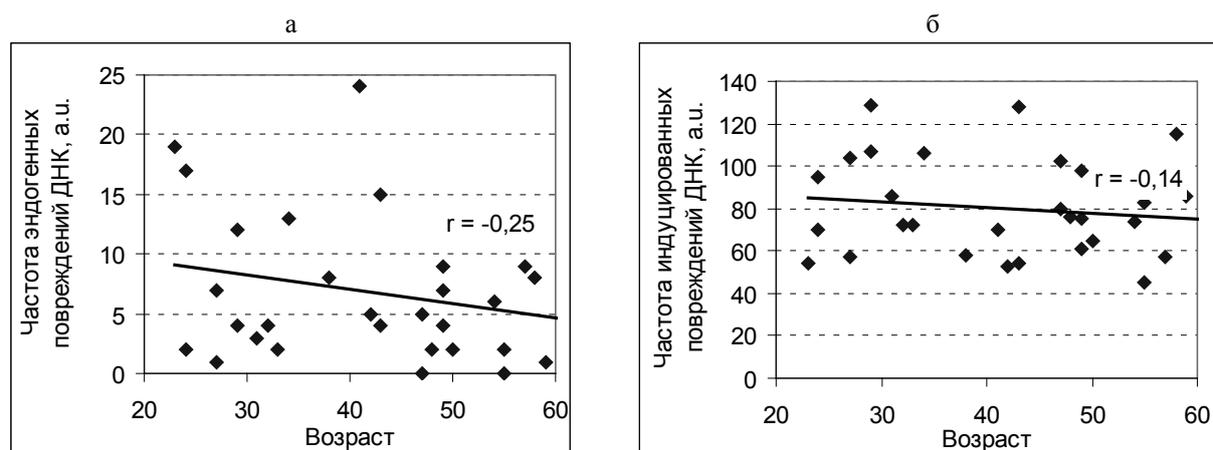


Рис. 2. Отсутствие зависимости частоты повреждений ДНК от возраста.

- а) частота эндогенных повреждений учитывалась на 180-й мин инкубации необработанных лимфоцитов;
б) частота индуцированных повреждений учитывалась на 0-й минуте после обработки лимфоцитов H_2O_2 .

На выборке из 30 человек нам не удалось установить зависимость частоты эндогенных и индуцированных окислительным стрессом

повреждений ДНК от возраста, что согласуется с данными некоторых других авторов, изучавших этот вопрос [12].

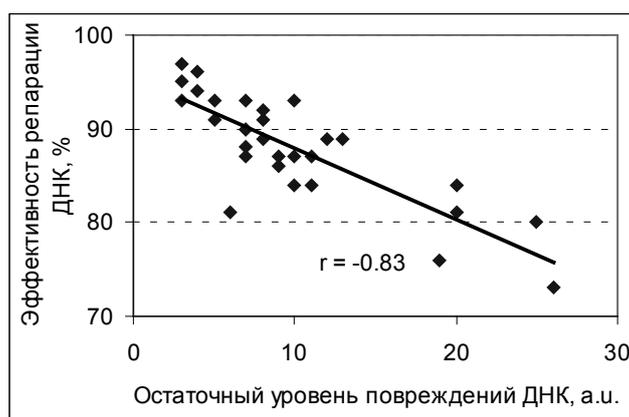


Рис. 3. Корреляция остаточного уровня индуцированных повреждений ДНК с эффективностью репарационного процесса (представлены результаты анализа на 180-й минуте после обработки лимфоцитов H_2O_2).

Показано, что остаточный уровень индуцированных повреждений ДНК зависит от эффектив-

ности репарации ДНК: чем выше эффективность репарации, тем ниже остаточный уровень по-

вреждений ДНК. Представленные данные свидетельствуют в пользу того, что выявленные закономерности вполне ожидаемы и характеризуют данную группу как адекватную для проведения дальнейшего сравнительного исследования.

Как известно, геномная нестабильность проявляется повышенным по сравнению с обычно наблюдаемым уровнем мутаций, который подерживается в отдаленные сроки после острого или при хроническом мутагенном воздействии как у данного организма, так и у его потомства. Одновременно отмечается снижение порога чувствительности к действию неблагоприятных факторов среды [1-3]. На основании данных литературы и собственных наблюдений нами выделены следующие *признаки геномной нестабильности*, которые доступны методу ДНК-комет:

- повышенный фоновый уровень повреждений ДНК;
- повышенная чувствительность генома к дополнительному мутагенному воздействию, которая проявляется более высоким по сравнению с контролем уровнем индуцированных повреждений на 0-минуте и повышенным остаточным уровнем индуцированных повреждений ДНК на 180-й минуте после мутагенного воздействия;
- снижение эффективности репарации поврежденной ДНК.

В этой работе в качестве предварительного критерия дестабилизации генома использованы среднегрупповые значения частоты повреждений ДНК плюс стандартное отклонение, а для эффективности репарации ДНК – среднегрупповые значения минус стандартное отклонение. В качестве второго, более строгого критерия, выбрано сочетание у одного индивидуума не менее двух признаков геномной нестабильности. На основании этих критериев выделено несколько человек с подозрением на дестабилизацию генома, которые объединены в подгруппу условного риска. Результаты сравнения средних показателей в этой подгруппе со среднегрупповыми показателями, отражающими реакцию генома на окислительный стресс, представлены на рисунке 4.

Видно, что в подгруппе условного риска уровень индуцированных повреждений ДНК во всех точках анализа превышает средне-групповой, однако достоверность этих различий доказана только для последней точки (180 мин – $t=2,75$; $P=0,03$). Что-

бы убедиться в наличии у этих лиц геномной нестабильности необходим повторный анализ.

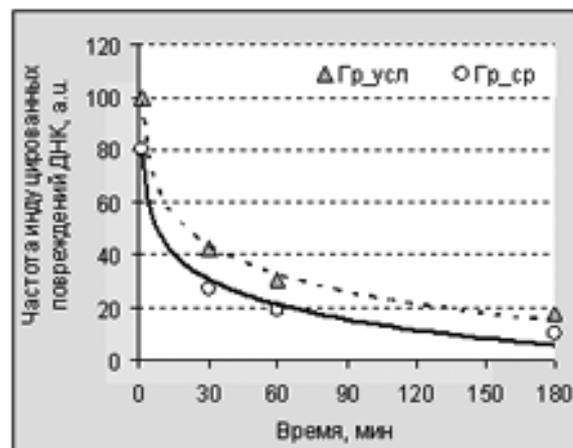


Рис. 4. Реакция генома на окислительный стресс и кинетика элиминации окислительных повреждений ДНК в подгруппе условного риска.

Гр_усл – подгруппа условного риска;

Гр_сл – группа сравнения.

Кроме внешних причин дестабилизации генома, к которым, прежде всего, относится длительный контакт с мутагенами, имеются и внутренние причины. Так, изучение состояния генома с помощью метода ДНК комет у пациентов с предполагаемым диагнозом СХН и некоторых других наследственных синдромов показало, что повышение фонового уровня повреждений ДНК и снижение порога чувствительности к окислительному стрессу может происходить за счет нарушения процесса репарации ДНК [9]. Другими авторами показано, что при анемии Фанкони, также относящейся к СХН, дестабилизация генома обусловлена не только дефектами репарации ДНК, но и неполноценностью систем антиоксидантной защиты клеток и организма, которые устраняют избыток свободных радикалов кислорода [13]. Поэтому обнаружение лиц, имеющих те или иные признаки дестабилизации генома, среди работников, не контактирующих с мутагенными факторами производственной среды, кажется вполне вероятным. В этом случае нестабильность генома будет отражать индивидуальные особенности организма без связи с вредными условиями труда. Для подтверждения такой тенденции необходимо значительно увеличить выборку.

Заключение

Проведена работа по оценке состояния генома у работников автомобильной промышленности (обследовано 30 добровольцев, у которых получено информированное согласие на участие в исследовании). Показано, что средние показатели, отражающие чувствительность ДНК к эндогенным и экзогенным (H₂O₂) повреждающим агентам, а также эффективность репарации ДНК, в этой

группе не отличаются от аналогичных показателей у здоровых доноров. Обнаружены индивидуальные особенности в состоянии генома. Подтверждена целесообразность использования новой технологии, основанной на применении метода ДНК-комет, для изучения статуса генома и выявления признаков геномной нестабильности в различных группах риска.

Список использованных источников

1. Transgenerational mutation by radiation / Y.E. Dubrova [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 405. – P. 37.
2. Ryabokon, N.I. Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout / N.I. Ryabokon, R.I. Goncharova // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2006. – Vol. 45, № 3. – P. 167-177.
3. Nomura T. Transgenerational effects of radiation and chemicals in mice and humans // *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. – 2006. – Vol. 47, Suppl. B. – P. B83-B97.
4. Литтл, Д.Б. Немишенные эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям / Д.Б. Литтл // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2007. – Т. 47, № 3. – С. 262-272.
5. Копнин, Б.П. Нестабильность генома и онкогенез / Б.П. Копнин // *Молекулярная биология*. – 2007. – Т. 41, № 2. – С. 369-380.
6. Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низко-интенсивному воздействию радиации в малых дозах / И.И. Сусков [и др.] // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2006. – Т. 46, № 2. – С. 167-177.
7. Анализ уровня aberrаций хромосом, эндогенных повреждений ДНК и чувствительности генома к окислительному стрессу в лимфоцитах человек / Р.И. Гончарова [и др.] // *Вести НАНБ, сер. мед. наук*. – 2008. – № 3. – С. 77-85.
8. Индуцированная геномная нестабильность как фактор заболеваемости. Оценка целостности генома человека методом ДНК-комет / Р.И. Гончарова [и др.] // *Сборник научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика»*. – 2008. – Т. 7. – С. 86-92.
9. Оценка статуса генома методами цитогенетического анализа и ДНК-комет у пациентов с множественными врожденными пороками развития / Н.В. Савина [и др.] // *Сборник научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика»*. 2009. Т. 9, С. 127-133.
10. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing / R.R. Tice [et al.] // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2000. – V. 35. – P. 206-221.
11. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations / A.R. Collins // *Mol. Biotechnology*. – 2004. – Vol. 26. – P. 249-261.
12. The Comet Assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors / P. Moller [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2000. – Vol. 9. – P. 1005-1015.
13. The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia / W. Ruppitsch [et al.] // *Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 99. – P. 710-719.

Дата поступления статьи 10 ноября 2009 г.

С.В. Дубовик^{1,2}, Н.Б. Гусина²

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПРЯМОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕДКИХ МУТАЦИЙ ГЕНА АТР7В У БЕЛОРУССКИХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КОНОВАЛОВА-ВИЛЬСОНА

¹Международный государственный экологический университет им. А.Д.Сахарова,
Республика Беларусь, 220009, г. Минск, ул. Долгобродская, 23,

²РНПЦ «Мать и дитя», Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская 66/9,

Введение

Болезнь Коновалова-Вильсона (БКВ) – наследственный дефект транспорта меди, приводящий к аккумуляции токсичного иона и повреждению паренхимы внутренних органов и нейронов головного мозга. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу и встречается с частотой 1: 30000. Без лечения болезнь имеет неуклонно прогрессирующее течение, с неизбежным летальным исходом спустя 5-10 лет от момента появления первых симптомов. БКВ является редким примером наследственного заболевания, для которого благодаря знанию основного патогенетического фактора еще до идентификации гена были разработаны высокоэффективные методы лечения. Своевременно начатая терапия этого заболевания либо предотвращает появление клинических признаков, либо ведет к их полному или частичному регрессу, восстанавливая трудоспособность и существенно улучшая состояние больных. В связи с возможностью эффективного патогенетического лечения ключевым является вопрос адекватной и максимально более ранней диагностики болезни. Широчайший клинический полиморфизм, характерный для данного заболевания, существенно затрудняет диагностику его на основании клинических признаков и симптомов. Биохимическими методами диагностики БКВ владеют очень не многие лаборатории. Между тем, в последние десятилетия достигнут существенный прогресс в понимании патогенетических механизмов заболевания и разработке эффективных методов лечения, создающих для пациентов возможность жить полноценной жизнью.

В 1993 году был открыт ген АТР7В, включающий в себя локус, повреждения нуклеотидной последовательности которого ведет к развитию БКВ [1, 2]. Ген АТР7В кодирует фермент АТФазу, которая участвует в транспорте ионов меди. Результатом нарушения функции АТР7В у больных с БКВ является токсическое накопление меди в печени, а в последующем и в других тканевых депо. К настоящему времени у больных с БКВ из большого числа популяций мира идентифицировано уже около 300 различных мутаций в гене АТР7В, в основном представляющих собой нуклеотидные замены и короткие делеции/вставки [3-6], причем в разных этнических группах спектр мутаций указанного гена у больных имеет свои особенности [5, 7-14].

После открытия первичного молекулярного дефекта появилась реальная возможность осуществлять непосредственный анализ повреждений в гене АТР7В, ведущих к развитию болезни Коновалова-Вильсона, сопоставлять характер мутаций в различных популяциях. Расширились диагностические возможности для данного заболевания [15], появились перспективы дородовой диагностики и установления носительства в семьях повышенного риска. Однако, в связи с большим размером гена АТР7В (21 экзон) и разнообразием мутаций в нем прямая ДНК-диагностика БКВ является дорогим и трудоемким процессом. Установление характерного спектра мутаций АТР7В в конкретной изучаемой популяции и выделение мажорных мутаций, встречающихся в данной популяции с высокой частотой, существенно упрощает пря-

мую ДНК-диагностику болезни. Обнаружение таких мажорных мутаций у белорусских пациентов позволит проводить ДНК-диагностику в Беларуси, избегая необходимости исследовать всю кодирующую область гена.

Проведенные нами ранее исследования показали, что наиболее частой мутацией гена АТР7В у белорусских пациентов с БКВ является Н1069G. Ее частота составила 57 % от всех мутантных аллелей (47/82). Это одна из самых высоких частот мутации Н1069G среди изученных европейских популяций. Высокая частота мутации Н1069G позволяет использовать выявление указанной нуклеотидной замены в качестве основного молекулярно-генетического теста при обследовании бело-

русских пациентов с БКВ. Для дальнейшего исследования спектра мутаций гена АТР7В при БКВ в Беларуси нами был осуществлен анализ 8-го и 15-го экзонов гена АТР7В у тех пациентов из группы исследования, у кого один либо оба мутантных аллеля были неизвестны. Выбор экзона для дальнейшего исследования был обусловлен тем, что литературные данные свидетельствуют об относительно высокой частоте мутаций в этих экзонах у пациентов с БКВ в европейских популяциях [2, 16, 17]. Кроме того, при молекулярно-генетическом анализе семейного случая БКВ в Венском университете у наших пациентов была обнаружена мутация 2299incC в 8 экзоне.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови пациентов методом фенольно-хлороформной экстракции.

Мутационный анализ гена АТР7В проводился в группе пациентов с болезнью Коновалова – Вильсона, диагноз которым был поставлен на основании клинической картины заболевания и результатов биохимического исследования: уровень церулоплазмينا в сыворотке – менее 170 Ед/литр; экскреция меди

с мочой за 24 часа выше 0,045 мкг/сут.; медь в сыворотке ниже 70 мкг/дл.

Анализ 8-го и 15-го экзонов гена АТР7В был проведен среди пациентов с БКВ и их родственников, у которых не было обнаружено мутации Н1069G или указанная мутация присутствовала в гетерозиготном состоянии, т.е. второй мутантный аллель был неизвестен. Секвенирование 8-го экзона проведено в 18-ти образцах ДНК, 15-го экзона – в 23-ти образцах ДНК.

Для амплификации 8-го экзона использовали пару праймеров:

12.1 АТР7В	AACCCTTCACTGTCCTTGTC
12.2 АТР7В	AGGCAGCTCTTTTCTGAAC

Для амплификации 15 экзона использовали пару праймеров:

19.1 АТР7В	CTTTCACCTTCACCCCTCT
19.2 АТР7В	AGCTGACAGAGACAAAAGC

Амплификацию 8-го и 15-го экзонов гена АТР7В проводили в объеме 25 мкл: 24 мкл реакционной смеси и 1 мкл исследуемой ДНК. Реакционная смесь на 1 реакцию включала в себя: амплификационный буфер (10 – 2,5 мкл; 2мМ dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) – 1 мкл; MgCl 50 мМ – 0,8 мкл (25мМ – 1,6мкл); Taq –полимераза (5u/μ 0,2мкл; праймеры (10 мкМ) по 1 мкл каждого; H₂O (б/дист.) до конечного объема 25 мкл.

После первичной денатурации при темпера-

туре 94° в течение 4 мин. проводили 30 циклов амплификации со следующими параметрами: денатурация при 94° в течение 30 сек, отжиг праймеров при 55° в течение 30 сек, элонгация при 72° в течение 5 мин.

После ПЦР-амплификации осуществляли очистку амплификата с использованием колонок для очистки Wizard DNA Clean-Up System («Promega») либо в результате преципитации с этанолом.

Для проведения реакции с мечеными флуо-

рохромами дидезоксинуклеотидтрифосфатов. использовали коммерческий набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit «Applied Biosystems». Полученные в реакции секвениро-

вания флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК разделяли капиллярным электрофорезом на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 «Applied Biosystem».

Результаты и обсуждение

Секвенирование 8-го экзона выявило гетерозиготное носительство мутации 2299incC у трех пробандов из трех неродственных семей (рис. 1). Это вторая по частоте мутация гена АТР7В среди белорусских пациентов с БКВ—3,7% (3/82) всех мутантных аллелей. Ранее проведенное исследование семейного случая болезни Коновалова-Вильсона из нашей выборки, показало, что носительство этой мутации в сочетании с Н1069G приводит к развитию тяжелой формы печеночной патологии. В нашем ис-

следовании сочетание 2299incC с неизвестным мутантным аллелем обуславливало развитие тяжелой неврологической симптоматики.

Указанная мутация ведет к замене аминокислоты в области, которая является высоко консервативной среди эукариотических и прокариотических медь-транспортирующих АТФаз [16, 18, 19]. Мутация затрагивает регион гена, кодирующий трансмембранный домен и, вероятно приводит, к нарушению медь-транспортирующей функции АТФ-азы.

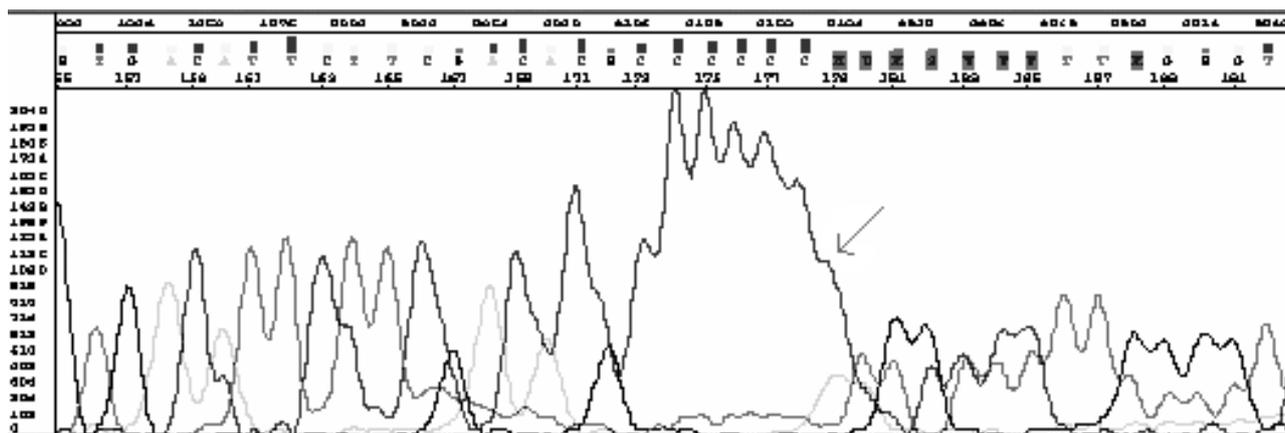


Рис. 1. Секвенирование 8-го экзона гена АТР7В.

Стрелкой указан пик, соответствующий вставке седьмого цитозина в нуклеотидную последовательность ДНК при мутации 2299incC.

Обнаруженная в четырех случаях нуклеотидная замена С→Т в 767 кодоне не приводит к изменению аминокислотной последовательности белковой молекулы и является полиморфизмом.

При секвенировании 15-го экзона у двух пациентов идентифицирована мутация I1102T (рис. 2). Мутация I1102T проявлялась клинически ранним (до 15-ти лет) поражением печени. Представляет интерес то, что данный аллель описан в основном у пациентов тюрк-

ского происхождения, но недавно он был идентифицирован у пациентов славянского происхождения чешскими учеными [16].

В случае двух пациентов с неврологической симптоматикой в результате секвенирования 15-го экзона найдена делеция 3400delC. В нашем исследовании обнаруженная делеция в компаунде с наиболее частой мутацией Н1069G приводила к развитию тяжелой неврологической симптоматики. Делеция 3400delC была определена как вторая по частоте мутация гена АТР7В среди пациентов из Чехии и Восточной Германии [16, 20]. Высокая ее частота определена также у российских пациентов [21]. Подобные

результаты позволяют сделать предположение о центрально- (восточно-) европейском происхождении делеции. Однако, недавно

проведенные исследования показали, что 3400delC является наиболее частой мутацией гена АТР7В у бразильских пациентов [22].

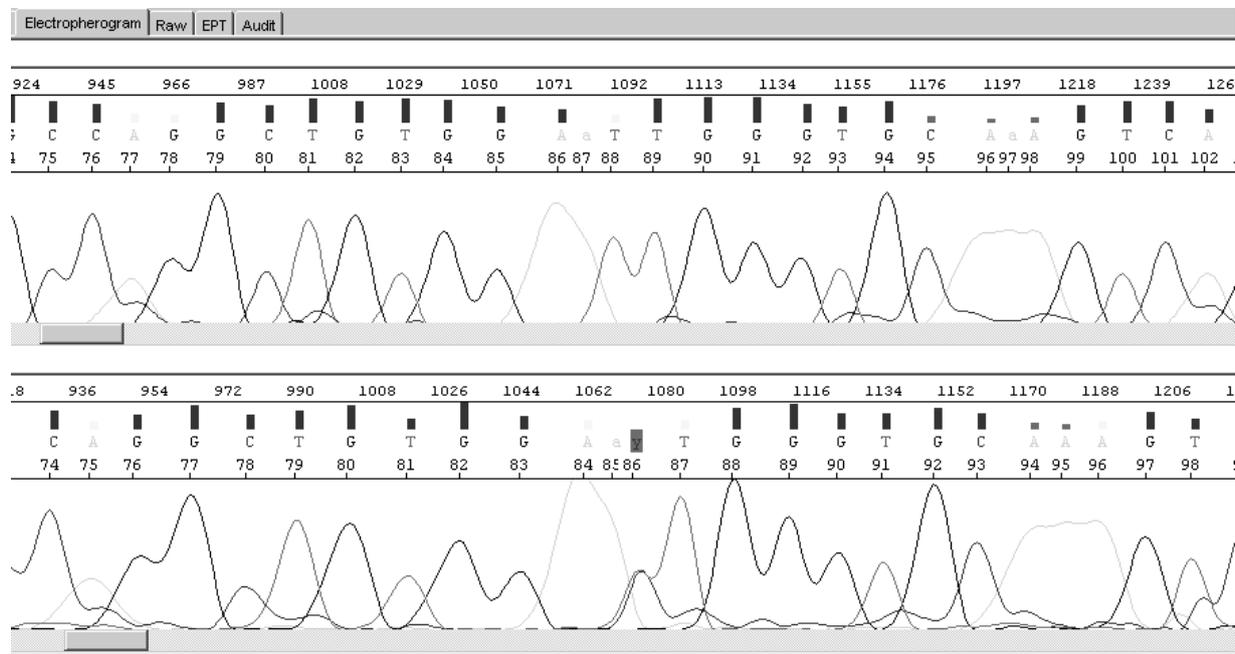


Рис. 2. Секвенирование 15-го экзона гена АТР7В.

Верхний ряд соответствует нормальной последовательности; нижний ряд содержит замену Т-С в позиции 1086 (светло-серый маркер).

Заключение

В результате проведенных исследований нами были идентифицированы три мутантных аллеля (помимо наиболее распространенного Н1069G), встречающихся среди белорусских пациентов с БКВ. Знание характерных для нашей популяции молекулярных дефектов при БКВ позволит

упростить ДНК-диагностику у таких пациентов. Кроме того, информация о связи отдельных мутантных аллелей с определенным фенотипом может быть важна при определении прогноза течения заболевания и выборе лечения в каждом конкретном случае болезни.

Список использованных источников

1. Bull, P.C. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. / G.R. Thomas, J.M. Rommens [et al.]. // *Nature Genet.*, 1993, v. 5, P. 327-337.
2. Petrukhin, K Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. / Fischer S.G., Pirastu M. [et al.] // *Nature Genetics*, 1993, Vol. 5, P. 338-343.
3. <http://www.medgen.med.ualberta.ca/database.html>.
4. Иллариошкин, С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в не-

врологии / С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова-Смоленская, Е.Д. Маркова// М.: Медицинское информационное агентство, 2000.

5. Loudianos, G. Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population – evidens of a founder effect / G. Loudianos [et al.]// *Hum. Mutat.* – 1999. – Vol. 14. – P. 294-303.

6. Cullen, L.M. Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, АТР7В, in patients with Wilson disease / L.M. Cullen [et al.] // *Clin. Genet.* – 2003. – Vol. 64. – P. 429-432.

7. Thomas, G.R. Wilson disease in Iceland: a clinical and genetic study / G.R. Thomas [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1995. – Vol. 56. – P. 1140-1146.
8. Kim, E.K. Identification of three novel mutations and a high frequency of the Arg778Leu mutation in Korean patients with Wilson disease / E.K. Kim [et al.] // *Hum. Mutat.* – 1998. – Vol. 11. – P. 275-278.
9. Nanji, M.S. Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease / M.S. Nanji [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 60. – P. 1423-1429.
10. Wan, L. Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients / L. Wan [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 345. – P. 734-738.
11. Margarit, E. Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population – identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in ATP7B gene / E. Margarit [et al.] // *Clin. Genet.* – 2005. – Vol. 68. – P. 61-68.
12. Yoo, H.W. Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease / H.W. Yoo [et al.] // *Genet. Med.* – 2002. – Vol. 4. – P.
13. Karabanov, A.V. Analysis of mutations in ATP7B gene and experience with direct DNA-diagnosis in hepato-lenticular degeneration / A.V. Karabanov [et al.] // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova.* – 2001. – № 101. – P.
14. Loudianos, G. Characterisation of the molecular defect in the ATP7B gene in Wilson disease patients from Yugoslavia / G. Loudianos [et al.] // *Genetic Testing.* – 2004. – Vol. 7. – № 2. – P. 107-112.
15. Butler, P. Molecular diagnosis of Wilson disease / P. Butler [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism.* – 2001. – Vol. 72. – P. 223-230.
16. Vrabelova, S. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease / Vrabelova S. [et al.] // *Mol. Gen. and Metabol.* – 2005 – Vol. 86 – P. 277-285.
17. Curtis, D. () A study of Wilson disease mutations in Britain / Curtis D. [et al.] // *Hum Mutat.* – 1999. – Vol. 14. – P. 304-311.
18. Tanzi, R.E. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene / R. E. Tanzi [et al.] // *Nature Genet.* – 1993. – Vol. 5. – P. 344-350.
19. Dijkstra, M. Adenosine triphosphate-dependent copper transport in isolated rat liver plasma membranes / M. Dijkstra [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 95. – P. 412-416.
20. Caca, K. High prevalence of the H1069Q mutation in East German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype analysis / K. Caca [et al.] // *J. Hepatol.* – 2001. – Vol. 35. – P. 575-581.
21. Anjali, B. Identification and analysis of mutations in the Wilson Disease gene (ATP7B): Population frequencies, genotype-phenotype correlation, and functional analysis / B. Anjali [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 61. – P. 317-328.
22. Deguti, M.M. Wilson disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients / M.M. Deguti [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2004. – Vol. 23. – P. 398.

Дата поступления статьи 10 июня 2009 г.

Н.В. Савина¹, О.В. Даливеля¹, М.П. Смаль¹, Т.Д. Кужир¹,
М. Воеводска², И. Бурачевска², И. Градска², Р.И. Гончарова¹

РАДИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМУТАГЕНА ДИГИДРО- ПИРИДИНОВОГО РЯДА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

¹ ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
Республика Беларусь, г. Минск 220072, ул. Академическая, 27

² Институт ядерной химии и технологии, Варшава, Польша

Введение

Генетическая безопасность и здоровье населения зависят от состояния окружающей среды, при этом ионизирующее излучение представляет серьезный фактор риска. Так, мониторинг последствий Чернобыльской катастрофы продемонстрировал генетические эффекты низких доз облучения, которые сопряжены с ускорением мутационного процесса в окружающей среде, развитием геномной нестабильности и усилением канцерогенеза [1–5]. В связи с ухудшением экологической обстановки наблюдается рост онкозаболеваемости. По данным Международного агентства по исследованию рака, через 20 лет нас ожидает увеличение случаев онкологических заболеваний более чем в полтора раза [6]. Эта проблема требует комплексного решения, что предполагает разработку новых методов ранней диагностики, профилактики и лечения рака на основе знаний молекулярных механизмов, ответственных за его этиологию и патогенез. Известно, что повреждения ДНК, реализующиеся в виде генных и хромосомных мутаций, приводят к злокачественной трансформации клеток. Защита генома от экзогенных и эндогенных мутагенов, поддержание его целостности и стабильности будет способствовать как предотвращению, так и подавлению канцерогенеза.

Одним из способов защиты генома является применение антимутагенов. Наиболее пристальное внимание уделяется веществам растительного происхождения, так как эпидемиологическими исследованиями показано, что диета, богатая антиоксидантами и растительными волокнами, имеет определяющее

значение для предотвращения рака [7]. Однако синтетические препараты могут оказаться не менее перспективными. Среди группы синтетических производных 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) нам удалось выявить эффективные антимутагены, которые защищают половые и соматические клетки животных от различных мутагенных факторов [8]. Один из исследованных нами препаратов в опытах на дрозофиле снижал частоту спонтанных мутаций на 80%. Как экспериментально установлено ранее, спектр аддуктов ДНК существенно не различается при спорадическом и индуцированном опухолеобразовании [9], что указывает на роль фонового мутагенеза в инициации рака. Поэтому столь уникальная способность препарата позволяет предположить наличие у него антиканцерогенной активности. Кроме того, исследования *in vivo* и *in vitro* показывают, что генопротекторная активность данного соединения обусловлена влиянием на репарацию ДНК [8, 10, 11]. В свою очередь, репарация ДНК рассматривается как важнейший механизм, вовлеченный в клеточный ответ на генотоксический стресс, и в то же время как молекулярная мишень терапевтического и превентивного воздействия при канцерогенезе [12]. Идея о возможности контролировать репарацию ДНК с помощью антимутагенов нуждается в подтверждении и детальном изучении на клеточном уровне. В данной статье представлены результаты изучения этого препарата на клетках млекопитающих, различающихся по метаболизму поли-ADP-рибозы и способности репарировать двунитевые разрывы ДНК [13, 14].

Материалы и методы

Линии клеток млекопитающих. Исследования выполнены на клетках лимфомы мыши L5178Y (№ 87111908 в ECACC – The European Collection of Cell Cultures – Европейская коллекция клеточных культур), которые любезно предоставлены профессором И. Шумель и коллегами из Отдела радиобиологии и защиты здоровья Института ядерной химии и технологии (г. Варшава, Польша). В опытах использованы две сублинии клеток лимфомы – LY-R (№ 90062802) и LY-S (№ 93050408), обладающие дифференциальной чувствительностью к ионизирующей радиации и другим ДНК-повреждающим агентам [13–15]. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10%-ной инактивированной телячьей сыворотки при 37°C и 5% CO₂.

Облучение и методы обработки антимутагеном. Повреждения ДНК и цитогенетические нарушения индуцировали рентгеновскими лучами с помощью исследовательской кобальтовой пушки ANDREX. В экспериментах, требующих культивирования клеток (т.е. при изучении выживаемости клеток и оценке частоты микроядер), облучение проводили в эквивалентных по повреждающему эффекту дозах: 1 Гр для линии LY-S и 2 Гр для LY-R. При оценке частоты первичных повреждений ДНК, которая не требовала культивирования клеток, применяли дозу 10 Гр – одинаковую для обеих сублиний, которая индуцирует двойные разрывы ДНК в количестве, достаточном для их идентификации с помощью метода ДНК-комет.

В качестве модулятора ответа клеток на облучение исследовали одно из производных 1,4-дигидропиридина (шифр AV-153) – 3,5-бис-этоксикарбонил-2,6-диметил-1,4-дигидропиридин-4-карбоксилат натрия, синтезированный в лаборатории мембраноактивных соединений и β-дикетонатов Латвийского института органического синтеза. Препарат обладает выраженной антиоксидантной активностью; его высокий антимутагенный потенциал установлен в различных тест-системах [8, 11]. Препарат в концентрациях 10⁻⁴М, 10⁻⁶М и 10⁻⁹М добавляли в суспензию клеток за 1 час до облучения. Облучение проводили в присутствии препарата, который оставался в клеточ-

ной суспензии до отбора проб для анализа.

Для оценки выживаемости клеток после их 48-часового культивирования использовали метод «исключения красителя». Известно, что трипановый синий не проникает сквозь мембраны живых клеток, тогда как мертвые окрашивает в голубой цвет. Краситель добавляли к клеточной суспензии в соотношении 1:9; подсчет клеток проводили в камере Бюркера; количество мертвых (голубых) клеток рассчитывали в процентах по отношению к общему числу клеток. Относительную выживаемость клеток рассчитывали в процентах по отношению к количеству клеток в контрольных вариантах: негативный контроль соответствовал необработанной клеточной суспензии (К); позитивный контроль – облучению (XR).

Для выявления первичных повреждений ДНК использован метод нейтрального гелеэлектрофореза единичных клеток (нейтральная версия метода ДНК-комет) в модификации [15], позволяющей идентифицировать исключительно двунитевые разрывы ДНК. Приготовление микропрепаратов в агарозном геле, процедуры по лизису, электрофорезу, нейтрализации и окрашиванию описаны ранее [16]. Препараты анализировали при флуоресцентном микрокопировании с помощью компьютерной программы Comet v.3.1 (рисунок 1 а), на каждом препарате просчитывали 50 клеток. При оценке повреждений ДНК в качестве основного показателя использовали «момент хвоста» (tail moment, ТМ), который отражает взаимодействие двух параметров: длины «хвоста» кометы и процент ДНК в «хвосте» [17]. *Для изучения процесса репарации ДНК* проводили отбор проб на 0, 15, 30, 60 и 120-й минуте после облучения клеток. Эффективность репарации ДНК (процент элиминированных повреждений ДНК) в этих пробах вычисляли по разности между показателями уровня повреждений ДНК в 0-й и экспериментальной точке относительно 0-й точки.

Цитогенетические нарушения анализировали с помощью микроядерного (МЯ) теста. Сразу после облучения в опытные и контрольные варианты клеточной суспензии добавляли цитохалазин В (5,6 мкг/мл, Sigma), который блокирует цитокinesis и способствует накоплению двуядерных клеток; фиксацию материала

производили на 16-м и 24-м часу инкубации клеток. Цитогенетические препараты анализировали при световой микроскопии с учетом всех требований, предъявляемых к этому тесту [18]. На каждом стекле просчитывали 1000 двуядерных клеток, в которых определяли микроядра (МЯ – рисунок 1 б). Одновременно учитывали такие показатели, как индекс ядерного деления – NDI (nuclear division index) и процент двуядерных клеток – BN (% binuclear), позволяющие оценить клеточную пролиферацию. NDI рассчитывали по формуле: $NDI = (1M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4 + 5M_5)/N$,

где M_1, M_2, M_3, M_4 – количество клеток, имеющих одно, два и т. д. ядра;

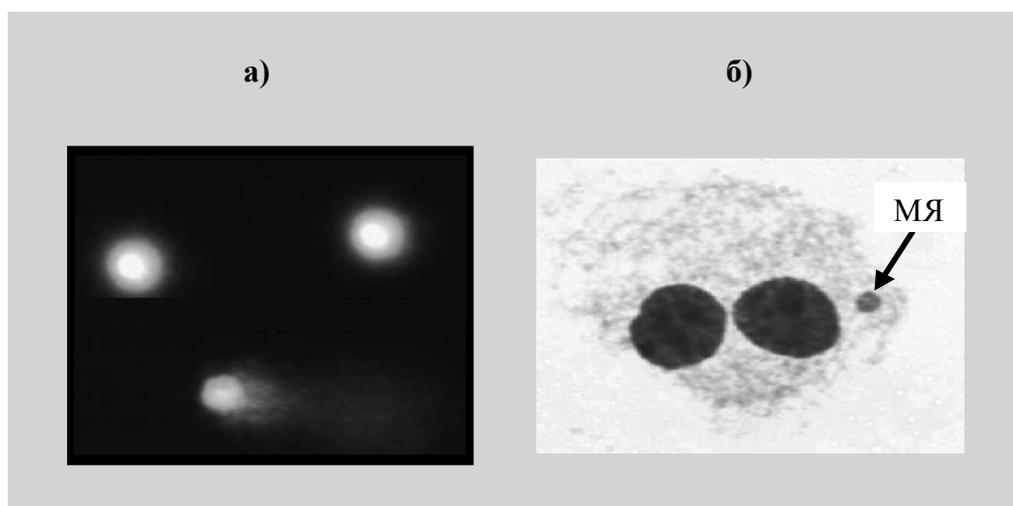
M_5 – количество клеток, имеющих более 4-х ядер;

N – 500 клеток, просчитанных на каждом стекле.

Эффективность антимутагена или редуцирующий фактор (РФ) вычисляли по формуле:

$$РФ = \frac{M - (AM + M)}{M} \times 100 \%,$$

где M – частота мутаций (или повреждений), индуцированных мутагеном; $AM+M$ – частота мутаций, наблюдаемых в варианте комбинированного воздействия антимутагена и мутагена. Этот показатель отражает долю событий, редуцируемых антимутагеном.



Результаты представляют средние значения не менее трех повторностей каждого эксперимента. Статистическая обработка данных проводилась с помощью стандартного пакета

программ Microsoft Excel-2000, а также пакета АБ-СТАТ [19]. Достоверность различий между вариантами определяли по критериям t Стьюдента и χ^2 .

Результаты и обсуждение

Сравнение радиочувствительности сублиний лимфомы LY-R и LY-S по различным параметрам. Данные по выживаемости клеток после их 48-часового культивирования представлены ранее [20]; здесь следует упомянуть, что ионизирующее излучение обладает более выраженным цитотоксическим эффектом по отношению к сублинии LY-S, чем к сублинии LY-R. В таблице 1 приведены сравнительные данные по уровню ДНК-повреждающих и цитогенетических

эффектов в этих сублиниях. Установлено, что облучение приводит к повышению уровня двуниевых разрывов ДНК в 3–4 раза по сравнению с эндогенным, при этом клетки LY-S отвечают на облучение несколько меньшим количеством повреждений, чем клетки LY-R. Однако следует принять во внимание, что сублиния LY-S в 2 раза чувствительнее к цитотоксическому действию облучения, что могло привести к элиминации части повреждений ДНК из клеточной попу-

ляции. Такая же тенденция сохраняется по отношению к индуцированному уровню МЯ на 16 ч фиксации материала. Ситуация изменяется

через 24 ч после облучения, когда частота МЯ в сублинии *LY-S* существенно превышает этот показатель в сублинии *LY-R*.

Таблица 1

Влияние X-лучей на частоту повреждений ДНК и цитогенетических нарушений в клетках лимфомы мыши

Сублиния <i>LY-R</i> (2 Гр)			Сублиния <i>LY-S</i> (1 Гр)		
ТМ	Количество клеток	Частота МЯ, %	ТМ	Количество клеток	Частота МЯ, %
Эндогенный уровень					
8,73±0,1	Фиксация на 16 ч		11,11±0,37 [#]	Фиксация на 16 ч	
	4000	3,5		3000	3,0
	Фиксация на 24 ч			Фиксация на 24 ч	
	5000	8,5*	4000	14,7* [#]	
Радиационно-индуцированный уровень					
36,77±1,46	Фиксация на 16 ч		29,82±1,49 [#]	Фиксация на 16 ч	
	5000	36,0		4000	11,0 [#]
	Фиксация на 24 ч			Фиксация на 24 ч	
	6000	27,2	5000	40,8* [#]	

* Достоверные различия между вариантами фиксации; [#] между линиями *LY-R* и *LY-S* (P<0,01)

При выполнении МЯ теста учитывали показатели ядерного деления, что дает очень важную информацию о клеточной пролиферации [21]. Данные представлены на рисунке 2, из которого видно, что NDI в облученных клетках *LY-R* практически не изменяется по сравнению с контролем, и уменьшается под влиянием X-лучей только в клетках *LY-S* (t=7.43; P=0.002). Частота двуядерных клеток (BN) при облучении сублинии *LY-S* уменьшается почти в 4 раза по сравнению с контролем и более чем в 3 раза относительно эффекта облучения в сублинии *LY-R* (t=7.44, P=0.006 и t=5.99; P=0.009, соответственно). Сходные изменения наблюдались при фиксации материала на 24-м часу культивирования клеток, однако частота двуядерных клеток *LY-S* после облучения оказалась выше – 35% по сравнению с 19% при фиксации материала на 16 часу, тогда как в сублинии *LY-R* осталась на прежнем уровне. Отсюда следует, что деление ядер в необлученных клетках обеих сублиний происходит примерно одинаково, но X-лучи существенно тормозят этот процесс в сублинии *LY-S*. Положительная динамика пролиферативной ак-

тивности *LY-S* на 24-м часу культивирования согласуется со сдвигом максимальной продукция микроядер на более поздний срок относительно сублинии *LY-R*.

Учитывая выявленные закономерности, целесообразно сравнивать максимальные цитогенетические эффекты (т.е. 36% МЯ для *LY-R* и 41% МЯ для *LY-S*), сопоставление которых с уровнем индуцированных двунитевых разрывов ДНК (36,8 и 29,8 ед. соответственно) показывает, что на единицу первичных повреждений ДНК реализуется почти в полтора раза больше цитогенетических нарушений в сублинии *LY-S*, чем в сублинии *LY-R*. Более точное представление о чувствительности клеток млекопитающих к облучению можно составить при пересчете биологических эффектов на единицу дозы. Рисунок 2 б показывает, что в этом случае максимальные частоты МЯ различаются в 2,3 раза (18 и 41%, соответственно). Количество разрывов ДНК на единицу дозы (т.е., на 10 Гр), составляет 3,68 ед. для *LY-R* и 2,98 ед. для *LY-S*. Частота МЯ в пересчете на этот показатель в сублинии *LY-S* выше, чем в сублинии *LY-R* почти в 3 раза.

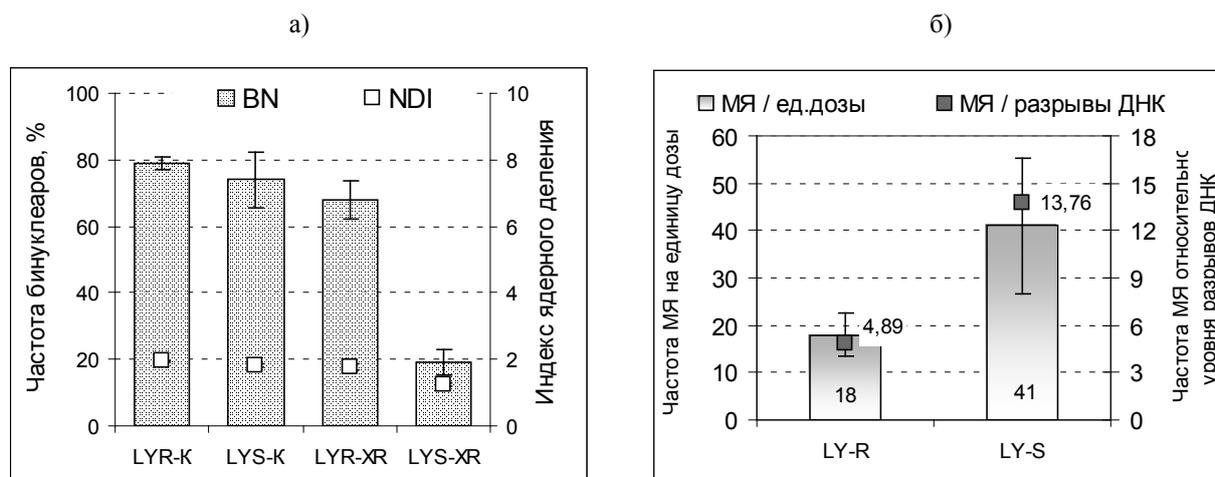


Рис. 2. Влияние облучения на пролиферативную активность клеток (а) и сравнение частот микроядер на единицу дозы в клетках обеих сублиний (б).

Проведенный анализ указывает на реализацию большего количества цитогенетических нарушений в сублинии *LY-S* по сравнению с *LY-R*, что может быть обусловлено дефектом репарации

двунитевых разрывов ДНК. Наличие дефекта репарации в клетках *LY-S* подтверждает кинетика выхода повреждений и расчеты эффективности репарации ДНК (РФ) после облучения (таблица 2).

Таблица 2

Кинетика выхода индуцированных повреждений ДНК в клетках сублиний лимфомы мыши

Время после облучения (мин)	Сублиния LY-R (10 Гр)		Сублиния LY-S (10 Гр)	
	ТМ	РФ, %	ТМ	РФ, %
0	36,77±1,46		29,82±1,49 [#]	
15	19,20±0,85*	48	19,70±0,99*	34
60	13,58±0,74*	63	13,95±0,82*	53
120	9,25±0,35*	75	11,02±0,52*	63

* Достоверные различия между 0-й и остальными точками анализа; [#] – между сублиниями (P<0,01).

Видно, что за первые 15 мин репарируется около 50% индуцированных двунитевых разрывов ДНК в клетках *LY-R* и только треть в клетках *LY-S*. К концу инкубации частота индуцированных повреждений ДНК приближается к эндогенному уровню, при этом эффективность репарации ДНК за 120 мин составляет 75% для сублинии *LY-R* и 63% для сублинии *LY-S*.

Результаты исследования чувствительности изученных клеточных линий к эндогенным и экзогенным повреждениям генома позволяют сделать вывод о том, что наблюдаемые различия обусловлены дефектом репарации дву-

нитевых разрывов ДНК в сублинии *LY-S*, что согласуется с данными предыдущих исследований [13–15]. Представленные результаты подтверждают перспективность использования этих линий для изучения модификации антимутагенами клеточного ответа на ионизирующее излучение, а также механизмов действия антимутагенов, основанных на стимуляции репарации двунитевых разрывов ДНК и/или контроллинга сигнальных путей, вовлеченных в репарационный процесс либо регуляцию клеточного цикла.

Влияние антимутагена дигидропиридинового ряда на клеточный ответ на эндогенные и

экзогенные повреждения генома *in vitro*. Как показано ранее [20], препарат не влияет на рост клеток *LY-R* и *LY-S*, но способен оказывать антицитотоксическое действие, которое проявляется в клетках обоего типа. При изучении пролиферативной активности клеток лимфомы мыши и китайского хомячка (*CHO-K1* и *xrs-6*) эффект антимутагена, в том числе и при облучении, также отсутствовал.

По отношению к ионам кальция производные 1,4-ДГП делятся на три группы: антагонисты, препараты с промежуточной ингибирующей активностью и не обладающие таким действием [22]. У исследованного нами препарата эта функция не изучалась, однако, на основании особенностей его химической структуры [23] предполагается, что он не влияет на кальциевый сигналинг. По данным цитофлуориметрического анализа, препарат в дозах 10^{-9} - 10^{-5} М не изменял параметры клеточного цикла в промиелоцитарной линии клеток человека *HL-60* [11],

что позволяет отнести его к третьей группе. Результаты исследования на клетках лимфомы мыши, также как и цитируемые данные приводят к заключению, что изученный антимутаген не стимулирует пролиферацию опухолевых клеток независимо от их происхождения. Эти сведения имеют практическое значение для разработки способов коррекции терапии рака. Так, выявленный антицитотоксический потенциал препарата может быть использован для защиты здоровых тканей от повреждающего действия радиации.

Исследовано влияние препарата на процессы воссоединения двунитевых разрывов ДНК в облученных клетках млекопитающих (рис. 3). Предварительно проверен эффект антимутагена по отношению к эндогенным повреждениям ДНК при концентрации 10^{-6} М. Установлено, что препарат в данной концентрации не проявляет генотоксические эффекты в обеих сублиниях лимфомы.

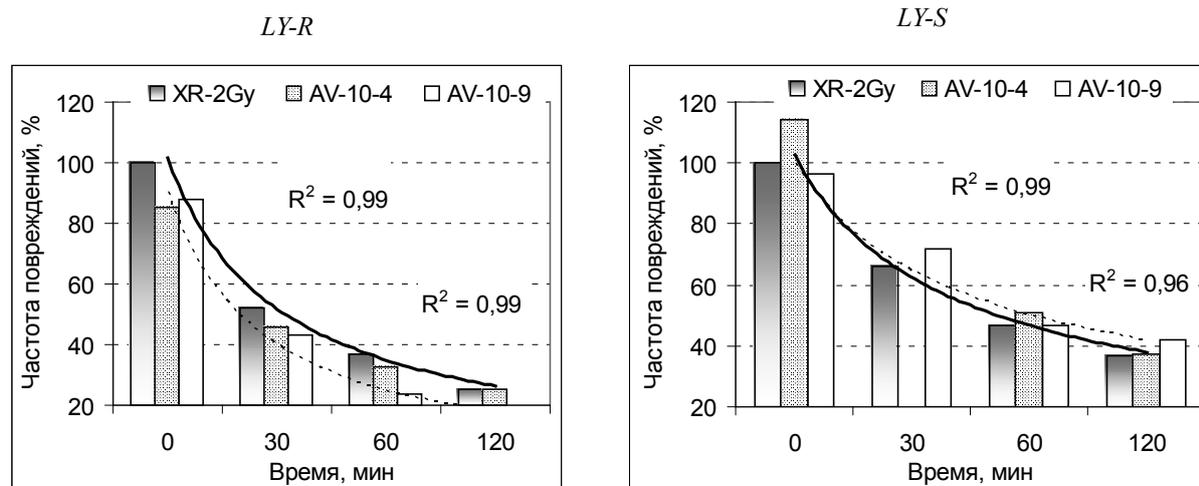


Рис. 3. Влияние антимутагена на кинетику выхода двунитевых разрывов ДНК относительно первоначально индуцированного уровня в клетках млекопитающих.

Влияние препарата на репарацию ДНК в облученных клетках изучено при дозах 10^{-4} и 10^{-9} М. Показано, что генопротекторная активность реализуется только в сублинии *LY-R*, т.е. на фоне нормального метаболизма поли-ADP-рибозы и полноценного процесса воссоединения двунитевых разрывов ДНК (NHEJ). Эффективность репарации ДНК достигает 12-36%. Характерно, что генопротекторный

эффект препарата в этих клетках сопровождается антикластогенным эффектом, выявленным в микроядерном тесте при тех же дозах [24]. Уровень радиационно-индуцированных цитогенетических повреждений редуцируется под влиянием антимутагена на 28-36%. Следует подчеркнуть, что генопротекторные и антикластогенные эффекты проявляются при обеих изученных концентрациях, причем эф-

эффективность наименьшей дозы не отличается, а в ряде случаев превосходит эффективность большей дозы. Следовательно, не происходит прямого взаимодействия молекул данного препарата с генотоксическими агентами вне- и внутриклеточной среды, и подтверждается способность соединений этой группы выступать в качестве триггеров эндогенных защитных систем [8, 25].

Эффективность и возможные механизмы действия изученного производного 1,4-дигидропиридина in vitro. Результаты сравнительного анализа эффектов препарата на различных клеточных моделях представлены в таблице 3. Препарат изучен в широком диапазоне концентраций (от 10^{-12} до 10^{-1} М), что позволило на клетках человека выявить цитотоксические дозы, подавляющие рост и выживаемость клеток [11, 26]. Показатель IC_{50} , установленный в культурах клеток человека, на несколько порядков превышает те дозы, которые использованы в нашем исследовании, а его значения, особенно для изолированных из периферической крови лимфоцитов, свидетельствуют об очень низкой токсичности данного соединения. Для сравнения IC_{50} для аскорбиновой кислоты по некоторым оценкам составляет 460–660 мкМ [27].

Установлена принципиальная способность препарата снижать уровень первичных повреждений ДНК, представленных как однонитевыми разрывами и комплексом других повреждений, оцениваемых с помощью щелочной версии метода ДНК-комет, так и двунитевыми разрывами ДНК, уровень которых определялся с помощью нейтральной версии. Однако сопоставление этих данных позволяет заключить, что препарат более эффективен против однонитевых разрывов, вызван-

ных различными мутагенными факторами (РФ=68%) [11, 26].

Выявлена антикластогенная активность препарата в культуре клеток *LY-R* [24] и лимфоцитах здоровых доноров [26], что соответствует данным, полученным *in vivo* [28]. На клетках *СНО-К1*, выращиваемых на специальной селективной среде, обнаружена антимутагенная активность препарата против радиационно-индуцированных точечных мутаций в локусе, ответственном за гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу (HGPRT). В этом случае эффективность радиопротекторного действия достигала 50% [29]. Антимутагенный эффект соответствовал генопротекторному, установленному с помощью щелочной версии метода ДНК-комет, но с обработкой клеточной суспензии FPG-ДНК-гликозилазой, которая узнает и удаляет специфические аддукты, вызванные окислением оснований ДНК [30].

Следует отметить, что, несмотря на то, что двунитевые разрывы ДНК рассматриваются в качестве маркера радиационного воздействия [31], пул первичных радиационных повреждений ДНК представлен и окислительными повреждениями, в частности, 8-оксигуанином [32]. В репарации двунитевых разрывов участвуют специализированные репарационные системы, восстанавливающие структуру ДНК путем гомологичной рекомбинации (HG) и воссоединением негомологичных концов (NHEJ) [33], тогда как повреждения, индуцированные активными формами кислорода (АФК) преимущественно устраняются системой эксцизионной репарации оснований (BER) [30, 34]. Сигнальной молекулой для запуска клеточного ответа на двунитевые разрывы ДНК является АТМ-киназа [35], а для инициации BER – поли-(ADP-рибозо)-полимераза (PARP) [36].

Таблица 3

**Сравнение эффективности действия антимутагена
в различных клеточных системах *in vitro***

Показатель	Доза, М	Линия клеток млекопитающих				Клетки человека			
		<i>LY-R</i> ¹	<i>LY-S</i> ¹	<i>CHO</i> ²	<i>xrs-6</i> ²	<i>HL-60</i> ³	<i>Raji</i> ³	Лимфоциты ³	
Цитотоксичность по частоте мертвых клеток	10 ⁻⁴	Не наблюдалась		–	Отмечена			–	
	10 ⁻²								
Выживаемость клеток	10 ⁻⁹ –10 ⁻⁴	Не стимулировал		–	IC ₅₀ =10.3mM	IC ₅₀ =14.9mM	IC ₅₀ =290.6mM		
Пролиферативная активность (NDI, BN)	10 ⁻⁹ –10 ⁻⁴	Не стимулировал		–	–	–	–		
Клонообразующая активность	10 ⁻⁹ –10 ⁻⁵	–	–	Не стимулировал		–	–	–	
Максимальная защита против цитотоксичности мутагенных факторов	10 ⁻⁹ –10 ⁻⁴	Против X-лучей (по частоте мертвых клеток)		–	–	–	–	Против H ₂ O ₂ (по выживаемости) 30%	
		62%	51%						
Генотоксичность	10 ⁻⁵ –10 ⁻⁶	Не выявлена							
Генопротекторная активность	против эндогенных повреждений	10 ⁻⁶	Против DSB не выявлена		–	–	Против SSB		
		10 ⁻⁹ –10 ⁻⁵					44%	–	54%
	против экзогенных повреждений	10 ⁻⁹ –10 ⁻⁴	Против X-лучей		–	Против γ-излучения, H ₂ O ₂ , ЭМС (SSB)			
		DSB	Нет	FPG-сайты					
		35%		50%					
	10 ⁻⁸ ; 10 ⁻⁹					37%	14%	68%	
Антикластогенная активность (МЯ)	10 ⁻⁹ –10 ⁻⁴	36%	Нет	–	–	–	–	–	
	10 ⁻¹⁰ –10 ⁻⁷							50%	
Антимутагенная активность	10 ⁻⁸	–	–	Мутации в локусе HGPRT 50%	–	–	–	–	

Примечание: ¹ данные, представленные в данной статье и других публикациях [20, 24]; ² данные, полученные в Отделе радиобиологии и охраны здоровья Института ядерной технологии и химии в рамках международного договора о научном сотрудничестве с Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси и любезно предоставленные польскими коллегами; ³ данные, опубликованные Н.И. Рябоконт с соавторами [11, 26]. В таблице приведены максимальные значения РФ, отражающие эффективность действия антимутагена в %. DSB – двуниевые разрывы ДНК; SSB – одонитевые разрывы ДНК; FPG-сайты – чувствительные к FPG-ДНК гликозилазе; IC₅₀ соответствует дозам, подавляющим на 50% рост и выживаемость культивируемых клеток.

Нами сделана попытка оценить влияние антимутагена на сигнальный путь, вовлекающий АТМ-киназу, и получены предварительные данные [20], указывающие на возможность использования препаратом этой молекулы в качестве мишени. Однако, более высокая эффективность препарата против одонитевых разрывов [11], а также двукратная редукция мутагенного эффекта радиации в клетках

CHO-K1 в сочетании со снижением уровня повреждений в FPG-чувствительных сайтах [29], свидетельствуют в пользу преимущественной элиминации окислительных повреждений ДНК. Удаление повреждений именно этого типа доказано польскими коллегами с помощью специального ELISA-теста, показавшего, что содержание 8-оксигуанина в ДНК из облученных клеток *CHO-K1* снижается под влиянием

антимутагена в 2 и более раз.

Комментируя эти данные, нельзя исключить антиоксидантный/антирадикальный механизм радиопротекторного действия препарата, тем более что облучение производилось в его присутствии. Как ранее упоминалось, эффективность антимутагенного действия ряда производных 1,4-дигидропиридина против спонтанных мутаций у дрозофилы зависела от их антиоксидантной и электронодонорной способности [8], то есть, при определенных условиях антимутагены этой серии могут служить ловушками свободных радикалов, в том числе АФК. Тем не менее, за счет этого механизма можно было бы объяснить лишь анти-цитотоксический эффект производного 1,4-дигидропиридина, отмеченный в обеих сублиниях лимфомы мыши. В остальных случаях активность препарата зависела от генотипа сублиний, и положительные эффекты проявлялись только на фоне полноценной репарации ДНК и нормального метаболизма поли-ADP-рибозы. Дефект NHEJ в сублинии *LY-S* препятствовал реализации генопротекторного и антикластогенного потенциала изученного препарата.

В ходе данного исследования установлено, что препарат может влиять на репарацию двунитевых разрывов, но более эффективен по отношению к окислительным повреждениям ДНК, по-видимому, за счет активации антиоксидантной защиты и/или BER. Возможно, молекула антиоксиданта инициирует сигнал, распространяющийся по генным сетям редокс-регуляции клеточных процессов. Об этом может свидетельствовать наиболее высокая эффективность препарата в малых (пико- и нано-молярных) концентрациях. Отсюда следует, что генопротекторный, антимутагенный и антикластогенный эффекты обусловлены, скорее всего, запуском клеточного ответа на облучение через модуляцию

сигнальной трансдукции.

Соединения этой серии являются аналогами дигидроникотинамида, входящего в NADH (редуцированную форму NAD⁺), чем обусловлены их антиоксидантные, фармакологические и биопротекторные свойства [37]. На этом же основании предполагалось, что антимутагены дигидропиридинового ряда могут влиять на поли-ADP-рибозилирование [8]. Положительные эффекты изученного антимутагена в сублинии *LY-R* и их отсутствие в сублинии *LY-S* указывают на такую возможность; кроме того, влияние на синтез поли-ADP-рибозы доказано молекулярными и иммуноцитохимическими методами на клетках человека [38]. Функционирование PARP напрямую зависит от внутриклеточного баланса никотинамида и NAD⁺, который используется этой полимеразой как источник поли-ADP-рибозы [36]. Нет противоречия в том, что препарат мог бы вмешиваться и в поли-ADP-рибозилирование, и в сигнальную трансдукцию, связанную с АТМ-киназой. Во-первых, известно о взаимодействии АТМ и PARP в ответе клеток на повреждения ДНК, вызванные радиацией [39]. Во-вторых, установлена реакция АТМ-киназы на окислительный стресс [40]. В-третьих, выявлено накопление повреждений ДНК и истощение пиридиннуклеотидов (NAD⁺) в клетках млекопитающих, дефектных по АТМ-киназе [41]. Недавно также показано, что содержание АТМ-киназы в нормальных и опухолевых клетках дает адекватное представление как о повреждении ДНК оксидантами, так и о защите ДНК антиоксидантами [42]. И, наконец, появились данные о том, что антиканцерогенные и другие защитные эффекты некоторых антиоксидантов (генистеина, резвератрола) опосредованы их влиянием на различные сигнальные пути с участием АТМ-киназы [43, 44]. Не исключено вмешательство препарата в другие сигнальные пути, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Таким образом, представленные результаты демонстрируют:

- отсутствие цитотоксичности и каких-либо генотоксических эффектов препарата дигидропиридинового ряда в изученном диапазоне доз в клетках млекопитающих;

- отсутствие стимулирующего влияния на пролиферацию опухолевых клеток;
- радиопротекторную активность по отношению к цитотоксическим, генотоксическим и цитогенетическим эффектам облучения;

- способность модулировать репарацию двуниевых разрывов ДНК, возможно, за счет влияния на сигнальную трансдукцию;

- высокую эффективность в элиминации окислительных повреждений ДНК;

- реализацию положительных эффектов при низких концентрациях, что в комплексе характеризует препарат как эффективный биопротектор с преобладанием индуцибельных механизмов действия, активирующих клеточный ответ на генотоксический стресс.

Препарат имеет перспективы практического использования для:

- защиты генома от ионизирующего излучения и других мутагенных факторов среды;

- поддержания стабильности генома в группах профессионального риска за счет элиминации окислительных повреждений и повышения эффективности репарации ДНК;

- предотвращения канцерогенеза и другой патологии, ассоциированной с окислительным стрессом;

- коррекции терапии рака и других заболеваний, в патогенезе которых существенную роль играют АФК и вызванные ими повреждения ДНК.

Список использованных источников

1. Transgenerational mutation by radiation / Y.E. Dubrova [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 405. – P. 37.

2. Ryabokon, N.I., Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout / N.I. Ryabokon, R.I. Goncharova // *Radiat. Environ. Biophys.* – 2006. – Vol. 45, N 3. – P. 167-177.

3. Воробцова, И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома / И.Е. Воробцова // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2006. – Т. 46, №4. – С. 441-446.

4. Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах / И.И. Сусков [и др.] // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2006. – Т. 46, №2. – С. 167-177.

5. Копнин, Б.П. Нестабильность генома и онкогенез / Б.П. Копнин // *Молекулярная биология*. – 2007. – Т. 41, №2. – С. 369–380.

6. Заридзе, Д.Г. Эпидемиология, механизмы канцерогенеза и профилактика рака / Д.Г. Заридзе // *Материалы III съезда онкологов и радиологов СНГ. Часть I. Минск, 25-28 мая, 2004. – Минск, ОДО «Тонпик» 2004. – С. 31-36.*

7. Ferguson, L.R. Dietary cancer and prevention using antimutagens / L.R. Ferguson, M. Philpott, N. Karunasinghe // *Toxicology*. 2004. – Vol. 198, N 1-3. – P.147-159.

8. Кужир, Т.Д. Антимутагены и химический мутагенез в системах высших эукариот / Т.Д. Кужир. – Минск: *Технология*. – 1999. – 267 с.

9. Gupta, R.C. Background DNA damage from endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence? / R.C. Gupta, W.K. Lutz // *Mutat. Res.* – 1999. – Vol. 424. – P. 1-8.

10. Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 1,4-дигидроизохинолиновой кислоты / О.В. Даливелля [и др.] // *Цитология и генетика*. – 2005. – Т. 39, №5. – С. 62-72.

11. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cell in vitro / N.I. Ryabokon [et al.] // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol. 587. – P. 52-58.

12. Кужир, Т.Д. Некоторые аспекты прогноза, профилактики и лечения рака с учетом роли репарации ДНК в канцерогенезе (Обзор) / Т.Д. Кужир // *Сборник научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика»* – 2008. – Т. 7. – С. 25-41.

13. Szumiel, I. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: general characteristics / I. Szumiel // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2005. – Vol. 81. – P. 339-352.

14. Szumiel, I. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 2: response to ionizing radiation / I. Szumiel // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2005. – Vol. 81. – P. 353-365.

15. Wojewodzka, M., A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-

single-stranded DNA antibody / M. Wojewodzka, I. Buraczewska, M. Kruszewski // *Mutat. Res.* – 2002. – Vol. 518. – P. 9-20.

16. Сравнение двух сублиний клеток млекопитающих по уровню эндогенных и индуцированных радиацией повреждений генома / Н.В. Савина [и др.] // *Вести НАНБ, сер. биол. наук.* – 2008. – № 3. – С.44-48.

17. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies / E. Lee [et al.] // *Toxicological Sciences.* – 2004. – Vol. 81, N 1. – P. 121-132.

18. The Human Micronucleus Project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans / M. Fenech [et al.] // *Mutat. Res.* – 1999. – Vol. 428. – P. 271-283.

19. Дромашко, С.Е. Очерки биоинформатики / С.Е. Дромашко. – Минск: Беларуская навука. – 2009. – 400 с.

20. Жизнеспособность и пролиферация клеток млекопитающих под влиянием антимутагена дигидропиридинового ряда / О.В. Даливеля [и др.] // *Сборник научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика».* – 2008. – Т. 7. – С. 49-55.

21. Ингель, Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока / Ф.И. Ингель // *Экологическая генетика.* – 2006. – Т. 4, № 3 – С. 7-19.

22. Study of interaction of 1,4-dihydropyridine derivatives with glucocorticoid hormone receptors from the rat liver / A. Vaitkuviene [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2006. – Vol. 58, N 4. – P. 551-558.

23. *Comprehensive Medicinal Chemistry* / C. Hansch as a chairmen of Editorial Board. – Pergamon Press, Oxford, New York. – 1990. – Vol. 3. – P. 1072-1084.

24. Влияние антимутагена – производного 1,4-дигидропиридина – на цитогенетический эффект радиации в клетках лимфомы мыши / Н.В. Савина [и др.] // *Материалы Международной научная конференция «Фундаментальные и прикладные аспекты генетики».* – Минск, 3-6 декабря 2008. – Минск, 2008. – С. 324-326.

25. Гончарова, Р.И. Теоретические и практические аспекты антимутагенеза /

Р.И. Гончарова // *Сборник научных трудов международной научной конференции «Современные проблемы генетики».* – Минск, 17-18 ноября 2005. – Минск, 2005. – С. 21-25.

26. Результаты исследований генопротекторной активности одного из перспективных производных 1,4-дигидропиридина с использованием клеток человека *in vitro* / Н.И. Рябоконт [и др.] // *Сборник научных трудов «Молекулярная и прикладная генетика».* – 2008. – Т. 7. – С. 105-109.

27. Miwa, N., Enhancement of ascorbate cytotoxicity by chelation with ferrous ions through prolonged duration of the action / N. Miwa, H. Yamazaki, Y. Ikari // *Anticancer Res.* – 1986. – Vol. 6, N 5. – P. 1033-1036.

28. Anticlastogenicity of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid in mouse micronucleus test / R. Goncharova [et al.] // *Mutat. Res.* – 2001. – Vol. 496. – P. 129-135.

29. Antimutagenic effect of 1,4-dihydropyridine derivatives in CHO-K1 cells / M. Woewodska [et al.] // *Abstracts of the Congress of Biochemistry and Cell Biology, Poland, Sept. 7-11, 2008.* – P. 256.

30. Dizdaroglu, M. Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects / M. Dizdaroglu, G. Kirkali, P. Jaruga // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – Vol. 45, N 12. – P. 1610-1621.

31. A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering / K.M. Prise [et al.] // *Radiat. Res.* – 2001. – Vol. 156, N 5. – P. 572-576.

32. Determination of 8-oxoguanine in individual cell nucleus of gamma-irradiated mammalian cells / S-K. Chen // *Radiat. Res.* – 2001. – Vol. 155. – P. 830-834.

Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation / G. Iliakis [et al.] // *Cytogenet. Genome Res.* – 2004. – Vol. 104, N 1-4. – P. 14-20.

33. Expression of base excision DNA repair genes is a sensitive biomarker for *in vivo* detection of chemical-induced chronic oxidative stress: identification of the molecular source of radicals responsible for DNA damage by peroxisome proliferators / I. Rusyn [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 3. – P. 1050-1057.

34. Nuclear ataxia-telangiectasia mutated (ATM) mediates the cellular response to DNA double strand breaks in human neuron-like cells / S. Biton [et al.] // J Biol Chem. – 2006. – Vol. 281, N 25. – P. 17482-17491.
35. Malanga, M., The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network/ M. Malanga, F.R Althaus // Biochem. Cell Biol. – 2005. – Vol. 83, №3. – P. 354-364.
36. Dihydropyridine derivatives as bio-protectors / G. Duburs [et al.] // Chemistry today. – 2008. – Vol. 26, N 1-2. – P. 68-70.
37. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining / N.I. Ryabokon [et al.] // Mutat. Res.– 2008. – Vol. 637, N 1–2. – P. 173-181.
38. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition / R. Aguilar-Quesada [et al.] // BMC Mol Biol. – 2007. – Vol. 8. – P. 29.
39. Barzilai, A. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage / A. Barzilai, G. Rotman, Y. Shilon // DNA Repair (Amst). – 2002. – Vol. 1, N 1. – P. 3-25.
40. Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice / N. Stern [et al.] // J Biol Chem. – 2002. – Vol. 277, N 1. – P. 602-608.
41. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants / T. Tanaka [et al.] // Cell Cycle. – 2006. – Vol. 5, N 17. – P. 1940-1945.
42. The isoflavonoids genistein and quercetin activate different stress signaling pathways as shown by analysis of site-specific phosphorylation of ATM, p53 and histone H2AX / R. Ye [et al.] // DNA Repair (Amst). – 2004. – Vol. 3, N 3. – P. 235-244.
43. Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner / S.A.Gatz[etal.]//Carcinogenesis.–2008.–Vol.29, N 3. – P. 519-527.
- 44.

Дата поступления статьи 10 декабря 2009 г.

Л.Н. Кострова, Д.А. Ушакова, И.П. Аношенко

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27

Введение

Нанотехнологии и наноматериалы в настоящее время являются одним из самых перспективных направлений научно-технических разработок, которые способствуют получению материалов с принципиально новыми свойствами и функциональными возможностями, за которыми – большое будущее.

Резкое увеличение масштаба реализуемых нанотехнологий, возрастающее число исследований и разработок в этой области остро ставят вопрос о влиянии наноматериалов на окружающую среду и здоровье людей.

Поэтому оценка безопасности наночастиц должна входить в число важнейших приоритетов [1,2].

Развитие разработок в области нанотехнологий и наноматериалов привело к формированию в последние годы нового направления исследований – нанотоксикологии, в котором изучаются возможные вредные последствия контакта человека с нанообъектами. Исследования воздействия нанопорошков на организм, выполненные *in vitro* и *in vivo*, убедительно свидетельствуют о возникновении воспалительных процессов, окислительных стрессов, апоптоза, нарушения производства цитокина и других реакций, возникающих вследствие контакта организма с наночастицами [3-9].

В то же время данные о генетических эффектах наночастиц, имеющиеся в научной литературе, противоречивы. В ряде работ при использовании метода Комет (comet assay) показано, что углеродные нанотрубки способны вызывать повреждения ДНК [10,11]. Так, согласно работе [10], фуллерены, разведенные в воде и этаноле, оказывают влияние на лимфоциты человека, вызывая в них генотоксический эффект.

В исследовании [11] установлено, что наночастицы способны не только повреждать ДНК, но и индуцировать рак. Так, при воздействии водных дисперсий C60 или кремниевых фуллеренов наблюдалось одновременно дозо- и время- зависимое увеличение числа одиночных и двойных разрывов ДНК в клетках рака молочной железы.

Авторы [12] считают, что генотоксический эффект наночастиц связан с их способностью образовывать комплексы с вредными химическими веществами, например, с частицами выхлопов дизельного топлива, содержащими атомы углерода, которые могут быть связаны с органическими материалами – полициклическими ароматическими углеводородами и переходными металлами. Они вызывают повреждение ДНК частично с помощью окислительных механизмов, часть из которых, в свою очередь, может быть связана с воспалительными процессами.

Однако группа ученых из Украины [15] подвергли сомнению данные, полученные в исследованиях [10,11] с использованием метода Комет (single-cell gel electrophoresis assay) т.к., по их мнению, данный метод неприемлем для анализа генотоксических свойств водных дисперсий наночастиц фуллеренов и оксидов кремния.. Более того, в работе этих же авторов [15] полностью опровергается какое-либо негативное действие гидратированных фуллеренов на живые организмы и, наоборот, приводятся факты их удивительной, положительной биологической активности. Аналогично, в работе [16] было показано, что водорастворимые дериваты фуллеренов обладают антиоксидантными эффектами, снижая перекисное окисление липидов в кератиноцитах человека

при воздействии ультрафиолета.

В связи с тем, что литературные данные достаточно противоречивы, невозможно сделать однозначные выводы о генотоксичности нанопорошков, и, в частности, наиболее часто используемых в нанотехнологиях углеродных нанотрубок, поэтому представляет несомненный научный и практический интерес исследование генетических эффектов углеродных

наночастиц в клетках мышей *in vivo*.

Особый интерес фуллерены представляют потому, что они обладают повышенным сродством к липидным структурам, способны образовывать стабильные комплексы с пептидами и ДНК-олигонуклеотидами, что определяет их применение в области создания эффективных систем доставки вакцин и генетического материала в живой организм [17].

Материалы и методы

Эксперименты проведены на самцах мышей линии СВА в возрасте 2–2,5 месяца. Влияние углеродных нанотрубок на спонтанный уровень хромосомных aberrаций в соматических клетках животных исследовали при разных способах введения в организм: 1) внутривенно – в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг массы животного и 2) при вдыхании – в концентрациях 100, 200 и 500 мг/л в воздухе. При первом способе суспензию наночастиц в дистиллированной воде вводили животным с помощью зонда в желудок. При внутривенном – мышью помещали в эксикатор объемом 1 л воздуха с наночастицами и каждые 15 мин в течение 7 часов проводили вентиляцию воздуха, чтобы избежать осаждения

частиц. С контрольными животными проводили аналогичные манипуляции без наночастиц – введение дистиллированной воды или нахождение в эксикаторе с чистым воздухом. Забой животных проводили спустя 24 часа после воздействия.

Изучали частоту хромосомных перестроек в клетках костного мозга мышей стандартным методом.

Результаты экспериментальных исследований подвергали статистической обработке, используя пакет статистических программ Microsoft Excel (средняя арифметическая, ошибка средней арифметической). Оценку значимости различий средних арифметических определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Цитогенетические эффекты углеродных наночастиц в соматических клетках мышей при пероральном введении в организм. Проведено исследование влияния углеродных нанотрубок в

разных дозах: 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг массы животного на спонтанный уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние углеродных наночастиц при пероральном способе введения на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей

Вариант	Количество		Типы aberrаций		Aberrации		Aberrантные метафазы	
	мышей	метафаз	один. фраг.	парные фраг.	кол-во	% ± S _x	кол-во	% ± S _x
интактные	6	586	13	3	16	2,73± 0,67	16	2,73± 0,67
контроль (+H ₂ O)	6	366	7	1	8	2,18± 0,58	8	2,18± 0,58
5 мг/кг	6	313	5	1	8	2,56± 0,80	6	2,56± 0,80
25 мг/кг	6	799	12	14	26	3,25± 0,63	26	3,25± 0,63
50 мг/кг	6	450	10	17	27	6,00± 1,12*	22	4,89± 1,02

*P < 0,05

Выявлено, что у контрольных животных частота aberrантных метафаз и хромосомных перестроек составила $2,18 \pm 0,58\%$, т.е. не превысила спонтанного уровня aberrаций у интактных мышей – $2,73 \pm 0,67\%$.

Показано, что пероральное введение наночастиц в дозе 5 мг/кг не влияет на естественный мутационный процесс – процент aberrаций и aberrантных метафаз не превышает контрольного уровня. При введении углеродных наночастиц в дозе 25 мг/кг обнаружено незначительное, статистически не достоверное увеличение частоты aberrантных метафаз и хромосомных перестроек в клетках костного мозга – до $3,25 \pm 0,63\%$. В то же время при дозе 50 мг/кг наблюдалось достоверное повышение уровня хромосомных aberrаций до $6,0 \pm 1,12\%$ и частоты aberrантных метафаз до $4,89 \pm 1,02\%$ (таблица 1). Во всех вариантах хромосомные перестройки были представлены одиночными и парными фрагментами.

Таким образом, согласно полученным дан-

ным, пероральное введение углеродных наночастиц в дозе 50 мг/кг вызывает достоверное повышение частоты хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей.

Цитогенетические эффекты углеродных наночастиц в соматических клетках мышечной при внутрилегочном введении в организм. В связи с тем, что наночастицы могут проникать в организм не только перорально, но и при вдыхании загрязненного воздуха с наночастицами, изучено влияние углеродных наночастиц в концентрациях 100 мг/л, 200 мг/л и 500 мг/л на спонтанный уровень хромосомных перестроек при внутрилегочном (вдыхание воздуха с нанотрубками) введении в организм.

Полученные результаты представлены в таблице 2.

Как следует из полученных данных, у контрольных животных, содержащихся в эксикаторе с чистым воздухом, частота aberrантных метафаз ($2,35 \pm 0,62\%$) и хромосомных перестроек

Таблица 2

Влияние углеродных наночастиц при внутрилегочном способе введения на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышечной

Вариант	Количество		Типы aberrаций			Aberrации		Aberrантные метафазы	
	мышечной	метафаз	один. фраг.	пар. фраг.	множ. фраг.	кол-во	$\% \pm S_x$	кол-во	$\% \pm S_x$
интактные	6	706	13	3	-	16	$2,27 \pm 0,56$	16	$2,27 \pm 0,56$
контроль	6	595	12	3	-	15	$2,52 \pm 0,64$	14	$2,35 \pm 0,64$
100 мг/л	6	868	8	6	-	14	$1,61 \pm 0,43$	14	$1,61 \pm 0,43$
200 мг/л	6	606	24	6	-	30	$4,95 \pm 0,88^*$	28	$4,62 \pm 0,85^*$
500 мг/л	6	525	18	5	1	23	$4,38 \pm 0,89^*$	21	$4,00 \pm 0,86$

* $P < 0,05$;

Показано, что углеродные наночастицы в концентрациях 200 мг/л и 500 мг/л воздуха приводят к значительному увеличению частоты хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышечной (табл. 2). Так, при использовании нанопорошков в концентрации 200 мг/л достоверно увеличился уровень aberrаций с $2,52 \pm 0,64\%$ у контрольных мышечной до $4,95 \pm 0,88\%$. Уровень aberrантных метафаз также достоверно превысил контрольные значения.

Как видно из таблицы 2, углеродные нанотрубки в концентрации 500 мг/л достоверно повышают уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышечной до $4,38 \pm 0,89\%$, а частота aberrантных метафаз выросла до $4,00 \pm 0,86\%$. Во всех вариантах хромосомные перестройки представлены одиночными и парными фрагментами, а при концентрации фуллеренов 500 мг/л обнаружен 1 множественный фрагмент.

Таким образом, согласно полученным данным, при вдыхании воздуха, загрязнённого углеродными наночастицами в концентрациях 200 мг/л и 500 мг/л, выявлены генотоксические эффекты в клетках костного мозга мышей.

Необходимы дальнейшие исследования генетических эффектов углеродных нанотрубок, а также других типов наночастиц, обладающих различными химическими свойствами, которые потенциально способны вызывать генетические повреждения в организме.

Заключение

Изучены цитогенетические эффекты углеродных нанотрубок при пероральном введении в желудок в дозах 5, 25 и 50 мг/кг и при вдыхании воздуха с наночастицами в концентрациях 100, 200 и 500 мг/л воздуха в соматических клетках мышей линии СВА. Показано, что исследованные наночастицы в малых дозах не увеличивают выход хромосомных aberrаций в клетках костного мозга

мышей. В то же время при использовании углеродных нанотрубок в больших дозах (50 мг/кг при пероральном введении, а также 200 и 500 мг/л при вдыхании) обнаружены статистически достоверные генотоксические эффекты.

Результаты имеют практическое значение для разработки рекомендаций по безопасной работе с наночастицами и нанопорошками.

Список использованных источников

1. Colvin, V. The Potential Environmental Impact of Engineered Nanoparticles / V. Colvin // *Nature Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, №10. – P. 1166-1170.
2. Dreher, K.L. Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles / K.L. Dreher // *Toxicological Sciences.* – 2004. – Vol. 77. – P. 3-5.
3. Cardiovascular Responses in Unrestrained WKY Rats to Inhaled Ultrafine Carbon Particles / V. Holker [et al.] // *Inhal. Toxicol.* – 2005. – Vol. 17. – P. 29-42.
4. Howard, C.V. Nanoparticles and Toxicity, Annex to No Small Matter II: The Case for a Global Moratorium, Size Matters ETC Group Occasional Paper Series / C.V. Howard // *Toxicological Sciences.* – 2003. – Vol. 7. – P. 1.
5. Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials Environ / G.J. Jia [et al.] // *Sci. Technol.* – 2005. – Vol. 39. – P. 1378-1383.
6. King, D.W. Rates and Mechanism of Fe(II) Oxidation at Nanomolar Total Iron Concentrations. / D.W. King, H.A. Lounsbury, F.J. Millero // *Environ. Sci. Technol.* – 1995. – Vol. 29, № 3. – P. 818-824.
7. Pulmonary Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days after Intratracheal Instillation / Lam [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2004. – Vol. 77. – P. 126-134.
8. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells / A.A. Shvedova [et al.] // *Toxicol. Environ. Health A.* – 2003. – Vol. 66, № 20. – P. 1909-1926.
9. Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. / D.B. Warheit [et al.] // *Toxicological Sciences.* – 2004. – Vol. 77. – P. 117-125.
10. Stable colloidal dispersions of C60 fullerenes in water: evidence for genotoxicity / A. Dhanwan, [et al.] // *Environ Sci Technol.* – 2006. – Vol. 40, № 23. – P. 394-401.
11. DNA damaging effects of nanoparticles in breast cancer cells / Sara Pacheco [et al.] // *Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 14-18 April 2007 Los Angeles, CA, Abstract № 3477.*
12. Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon-black in f344 rats / K.J. Nikula [et al.] // *Mauderly Fund Appl Toxicol.* – 1995. – Vol. 25. – P. 80-94.
13. Hansen, T. Biological Tolerance of Different Nanoparticles / T. Hansen // *In: A Rat Model-Clinical and Histological Findings 7th World Biomaterials Congress.* – Sydney, 2004. – P. 752.
14. Biomaterial-induced sarcoma: a novel model to study preneoplastic change / C.J. Kirkpatrick [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2000. –

Vol. 156. – P. 1455-1467.

15. Andrievsky, G. Is C₆₀ Fullerene Molecule Toxic / G. Andrievsky, V. Klochkova, L. Derevyanchenko // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. –2005. – P. 363-376.

16. Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or perox-

ylipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes / L. Xiao [et al.] // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2005. – Vol. 23, № 59. – P. 351.

17. Hughes, G.A. Nanostructure-mediated drug delivery Nanomedicine / G.A. Hughes // Toxicol. Environ. –2006. – Vol. 1. – P. 22-30.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПАНСИИ СТG-ПОВТОРОВ В ГЕНЕ DMPK У ПАЦИЕНТОВ С МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИЕЙ 1 ТИПА

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», МЗ РБ
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, Орловская, 66

Введение

Миотоническая дистрофия представляет собой частую форму мышечной дистрофии взрослых (распространенность – от 2 до 15 на 100000 человек) [1]. Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу.

Заболевание характеризуется мультисистемностью поражения с широкой вариабельностью клинических проявлений, основными из которых являются миотония, мышечные атрофии и парезы скелетной мускулатуры, кардиомиопатия, катаракта, эндокринные нарушения [2, 3].

Первые симптомы обычно появляются в пубертатном возрасте или позже. Если мышечная слабость возникает до 20-летнего возраста, то она неуклонно прогрессирует и приводит к значительному снижению мышечной силы в кистях и стопах у взрослых пациентов. Для развернутой стадии болезни характерны миотония, слабость лицевой мускулатуры и дистальных отделов конечностей, катаракта, раннее облысение, эндокринные нарушения [4]. Лицо больных удлиненное и утонченное вследствие слабости височных и жевательных мышц; шея тонкая из-за атрофии грудиноключично-сосцевидных мышц; веки и углы рта опущены, нижняя половина лица провисает. Атрофии мышц конечностей наиболее выражены в дистальных отделах: предплечьях и малоберцовых мышцах, на поздних стадиях заболевания развиваются атрофии мелких мышц кистей. Эндокринные нарушения включают тестикулярную атрофию, бесплодие у женщин, гиперинсулинизм, сахарный диабет, атрофию надпочечников и нарушение секреции гормона роста. В поздних стадиях может развиваться тяжелая кардиомиопатия [5].

Ген, ответственный за развитие миотонической дистрофии, локализуется на хромосоме

19 в локусе q13.2-13.3 и кодирует синтез белка миотонинпротеинкиназы [6].

Миотоническая дистрофия – яркий представитель заболевания с «динамическим» типом мутации: у больных имеет место экспансия tandemных тринуклеотидных повторов СТG (цитозин-тимин-гуанин), расположенных в 3'-нетранслируемой области гена [7].

Природа генных дефектов, приводящих к развитию болезней «экспансии», заключается в увеличении числа тринуклеотидных повторов, расположенных в регуляторной или в кодирующей частях генов. Предположительно в основе механизма экспансии лежит нарушение процесса репликации микросателлитной ДНК, но целый ряд молекулярных аспектов в патогенезе болезней экспансии и их наследовании все еще остается непонятным и продолжает активно изучаться.

Увеличение числа повторов может по-разному сказываться на функциях соответствующих генов. При миотонической дистрофии увеличение числа тринуклеотидных повторов (СТG) нарушает транскрипцию и приводит к дефициту соответствующих белков (мутации типа loss-of-function) [8, 9]. Для тринуклеотидных повторов, экспансия которых блокирует функцию гена, характерен выраженный популяционный полиморфизм, причем их число в норме может варьировать от единиц до нескольких десятков. Особенностью заболевания является также эффект антиципации - нарастание тяжести симптомов заболевания в последующих поколениях в результате дальнейшего увеличения числа триплетов после того, как их количество превысило нормальное.

В случае миотонической дистрофии тяжесть заболевания особенно быстро нарастает при передаче мутантного аллеля от матери [10, 11].

Врожденная форма миотонической дистрофии наблюдается только при наследовании хромосомы с экспансией от матери. Данный факт объясняется тем, что количество тринуклеотидных повторов может увеличиваться в ходе мейоза, а при сперматогенезе этот процесс не происходит. Уменьшение длины мутантного повтора (почти до нормы) у потомков с легкой клинической картиной и бессимптомным течением наблюдается при отцовской передаче гена [12].

Непосредственное определение мутантного аллеля гена миотонинпротеинкиназы (DMPK) методом ПЦР может проводиться только у больных с небольшой степенью экспансии СТG-повторов (не более 100 триплетов) [13]. При большем числе повторов амплификация с помощью ПЦР обычно не достигается. В этих случаях размер фрагмента определяют методом блот-гибридизации по Саузерну с соответствующими ДНК-зондами [14].

Классификация аллелей по размеру была принята на Втором Международном Консор-

циуме по миотонической дистрофии в 1999 году [15]. Нормальные аллели содержат от 5 до 35 СТG повторов. Премутантные аллели – от 35 до 49 СТG-повторов. Лица с премутантными аллелями не имеют клинических проявлений, но при наследовании их детьми такой хромосомы имеется высокий риск развития проявлений миотонической дистрофии (если один из родителей имеет экспансию в гене DMPK, то риск для каждого его ребенка составляет 50%). Мутантные аллели – это аллели, содержащие более 50 СТG-повторов, которые ассоциированы с манифестацией заболевания.

Как показано в таблице 1, существует тесная корреляция между числом СТG-повторов и тяжестью клинического симптомокомплекса: пациенты с небольшой степенью экспансии триплетов (40-160 копий) имеют минимальные клинические проявления. Больные с развернутой клинической картиной имеют большее число копий триплетов.

Таблица 1

Корреляция длины СТG-повторов и фенотипа при миотонической дистрофии тип 1 [15, 16]

Число СТG-повторов	Клинические симптомы	Форма заболевания	Возраст начала заболевания
5-34	Отсутствуют	Норма	-
35-49	Отсутствуют	Премутация	-
50-150	Катаракта Легкая форма миотонии	Мягкая форма	20-70 лет
100-1000	Слабость Миотония Катаракта Кардиальные аритмии	Классическая	10-30 лет
>2000	Врожденная гипотония Умственная отсталость	Врожденная	С рождения до 10 лет

В данной работе представлены результаты, впервые выполненной в Беларуси молекулярно-генетической диагностики

миотонической дистрофии 1 типа у пациентов с клинически предполагаемым диагнозом.

Материалы и методы

Исследуемую группу для ДНК-анализа составили 36 пациентов и 39 членов их семей. Отбор больных проводился в соответствии с диагностическими критериями нервно-мышечных болезней, принятыми в 1998 году

Европейским Нервно-мышечным Центром. Учитывались клинические данные, возраст начала заболевания, темпы прогрессирования, семейный анамнез. Все пациенты осмотрены неврологом, окулистом и эндокринологом. Ма-

териалом для исследования являлась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови пробандов с клиническим диагнозом миотоническая дистрофия или с подозрением на нее, а также членов их семей.

Для молекулярно-генетической диагностики использовали прямое определение количества CTG-повторов в гене DMPK по размеру синте-

зированного методом ПЦР фрагмента.

Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Обработку данных и определение аллелей выполняли с помощью пакета компьютерной программы GENESCAN (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

По результатам ДНК-анализа было выявлено три семьи (3 пробанда и 9 членов их семей), в которых наблюдалась экспансия CTG-повторов. В первой семье, родословная которой представлена на рисунке 1, аллель с 70 CTG-повторами обнаружен у пациента (I.2) с минимальными клиническими проявлениями миотонической дистрофии. Результаты анализа DMPK-аллеля с экспансией представлены на рисунке 2. Небольшая экспансия определяет мягкую форму заболевания со стертыми клиническими проявлениями и поздним дебютом. Так как заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу, дети пациента имеют 50% риск наследования заболевания. В связи с этим им была рекомендована молекулярно-генетическая диагностика с целью исключения или подтверждения диагноза. У старшей дочери (II.1) было обнаружено два аллеля с нормальным

числом CTG-повторов (нормальный генотип), что свидетельствует об отсутствии заболевания. У младшей дочери (II.2) с симптомами заболевания был идентифицирован один аллель с нормальным числом CTG-повторов, который она унаследовала от матери и мутантный аллель с увеличенным числом CTG-повторов, унаследованный от отца. В данном случае при наследовании имела место мейотическая нестабильность аллеля с экспансией, которая и составляет основу феномена «антиципации» – нарастания тяжести клинических проявлений в последующих поколениях [17]. Внучка пациента имеет тяжелую врожденную форму миотонической дистрофии, как результат дальнейшего нарастания числа повторов при наследовании мутантного аллеля. Во всех случаях увеличение числа тринуклеотидных повторов было подтверждено блот-гибридизацией по Саузерну.

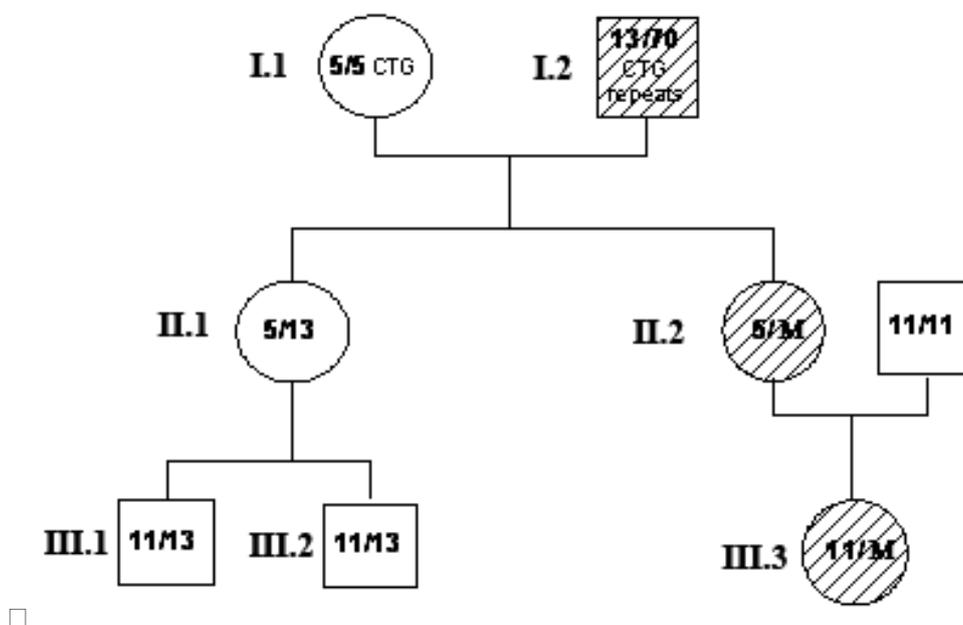


Рис. 1. Родословная семьи III.

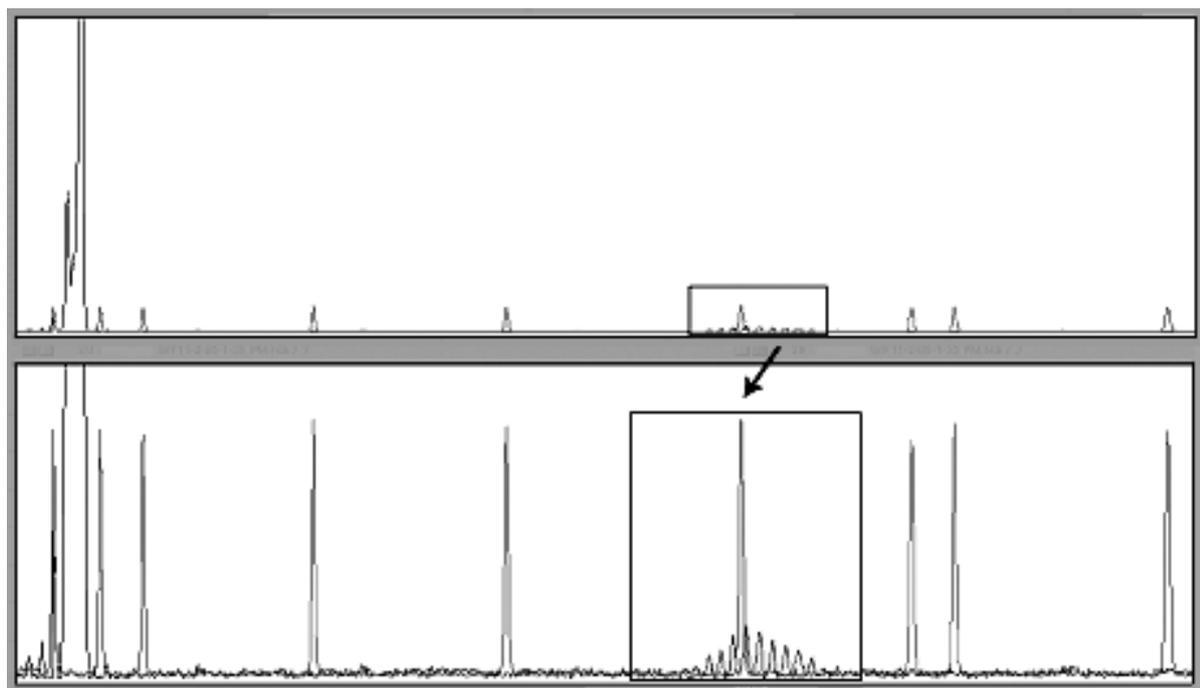


Рис. 2. Результаты анализа продуктов амплификации DMPK-аллелей с экспансией CTG-повторов. Вариант генотипа 13/70. Стрелкой показана экспансия тринуклеотидных повторов.

Как видно из родословной, представленной на рисунке 3, вторая семья представлена 6 больными с различной степенью тяжести клинических проявлений миотонии. Исследование показало, что отец пробанда (II.1) и три его сестры имеют один нормальный редкий аллель с 20 CTG-повторами. Частота этого аллеля в популяции Беларуси составляет 0,5% [18]. Соответственно, вероятность экспансии на второй хромосоме значительно выше, чем вероятность гомозиготного носительства данного аллеля. Пробанд III.1 также унаследовал от отца аллель

с высоким риском экспансии. Такие же результаты были получены и для дочери (III.2) одной из сестер (II.2). Во всех образцах увеличение числа CTG-повторов было подтверждено блот-гибридизацией по Саузерну. Пациенты III.3 и III.4 унаследовали от матери аллель с 20 CTG-повторами и являются гетерозиготами по двум нормальным аллелям. ДНК-анализ позволил исключить у них риск заболевания, несмотря на то, что у матери наблюдается типичная клиническая картина, характерная для классической формы миотонической дистрофии.

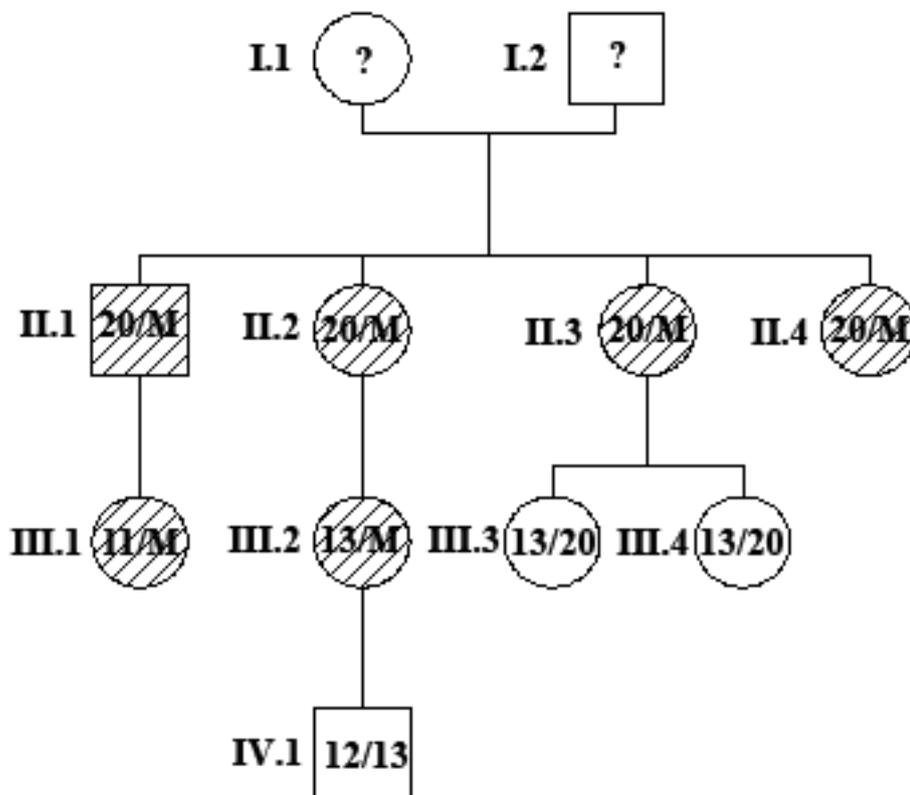


Рис. 3. Родословная семьи М.

Третья семья представлена тремя больными. Аллель с 86 CTG-повторами идентифицирован у пробанда с минимальными клиническими проявлениями миотонической дистрофии. У его

сына, унаследовавшего хромосому с экспансией, наблюдается классическая форма заболевания. Также диагноз «миотоническая дистрофия» был подтвержден у племянницы пробанда.

Заключение

Таким образом, прямое определение количества CTG-повторов в гене DMPK с помощью ПЦР-анализа является эффективным методом верификации или исключения диагноза миотонической дистрофии. Амплификация области триплетных повторов с последующим электрофоретическим анализом синтезированных продуктов позволяет провести генотипирование аллелей. Установление гетерозиготности является важным критерием для отбора нормальных образцов на первом этапе диагностики. При этом очень большое значение имеет разрешающая способность метода. Так как пары аллелей могут отличаться по длине всего на один тринуклеотид,

необходимо, чтобы после электрофоретического анализа свободно идентифицировались фрагменты ДНК с разницей в 3 п.н. Прямое определение количества CTG-повторов с использованием автоматического капиллярного электрофореза позволяет надежно определять такие аллели. При обследовании семьи с миотонической дистрофией имеется также возможность проследить передачу мутантного гена из поколения в поколение даже в случае невозможности идентификации экспансии (информативная семья). У больных определяется только один аллель с нормальным числом CTG-повторов, который унаследован от здорового родителя.

Список использованных источников

1. Emery A. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey / A. Emery // *Neuromuscul. Disord.* – 1991. – Vol. 1. – P. 19-29.
2. Buyse M. L. Birth defects / M.L. Buyse // 1990. – Vol. 2. – P. 1206-1208.
3. Dubowitz V. Muscle disorders in childhood / V. Dubowitz // – W.B. Saunders company, 2nd edition, 1995.
4. McKusick V. A. Mendelian inheritance in man / V.A. McKusick // – The Johns Hopkins University press, 3rd edition, 1992.
5. Яхно Н.Н. Болезни нервной системы / Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульман // – М.: Медицина. – 2001.
6. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member / J.D. Brook [et al.] // *Cell.* – 1992. – Vol. 68. – P. 799-803.
7. Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy / H.G. Harley [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1993. – Vol. 52. – P. 1164-1174.
8. Richards Robert I. Dynamic mutations: a decade of unstable expanded repeats in human genetic disease / Robert I. Richards // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10. – P. 2187-2194.
9. Иванов В.И. Геномика – медицине / В.И. Иванов, Л.Л. Киселев // – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005.
10. Бочков Н.П. Клиническая генетика / Н.П. Бочков // – М.: «Гэотар-мед», 2001.
11. Emery A. Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders / A. Emery // 2nd edition. – 1998. – P. 27-29.
12. Иллариошкин С.Н. Новый механизм мутации у человека: экспансия тринуклеотидных повторов (обзор) / С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова-Смоленская, Е.Д. Маркова // *Генетика.* – 1995. – Т. 31, № 11. – С. 1478-1489.
13. Иллариошкин С.Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова-Смоленская, Е.Д. Маркова // – М.: МИА, 2002.
14. Горбунова В.Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / В.Н. Горбунова, В.С. Баранов // – СПб.: Специальная литература, – 1997.
15. Second International Myotonic Dystrophy Consortium (2000)/ New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1).
16. Genotype-phenotype correlation in myotonic dystrophy / E. Gharehbaghi-Schnell [et al.] // *Clin. Genet.* – 1998. – Vol.53. – P. 20-26.
17. Мальшева О.В. Популяционный и семейный анализ повторов в гене IT-15 / О.В. Мальшева, Т.Э. Иващенко, В.С. Баранов // *Генетика.* – 2001. – Т. 37, №3. – С. 402-406.
18. Осадчук Т.В. Полиморфизм тринуклеотидных СТГ-повторов в гене миотонин-протеинкиназы в белорусской популяции / Т.В. Осадчук, К.А. Моссэ // *Вести АН РБ, мед. серия.* – 2009. – №1. – С. 61-65.

Дата поступления статьи 17 апреля 2009 г.

Т.В. Осадчук, К.А. Моссеэ, Н.В. Румянцева

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДУПЛИКАЦИИ ГЕНА RMR22 У ПАЦИЕНТОВ С НЕВРАЛЬНОЙ АМИОТРОФИЕЙ ШАРКО-МАРИ-ТУС

ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», МЗ РБ
Республика Беларусь, 220053 г. Минск, Орловская, 66

Введение

Невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тус (СМТ – от англ. Charcot-Marie-Tooth) или наследственная моторно-сенсорная невропатия (НМСН) – генетически гетерогенная группа наследственных заболеваний периферической нервной системы, проявляющихся сходным клиническим симптомокомплексом [1]. В основе болезни лежат дегенеративные изменения миелиновой оболочки или аксонов двигательных и чувствительных волокон периферических нервов. Клиническая дифференциация по типам возможна только на основе электронейромиографического (ЭНМГ) исследования. Соответственно этому, выделяют два основных типа заболевания: НМСН I – демиелинизирующий вариант болезни, характеризуется низкой скоростью проведения возбуждения по нервам (скорость проведения импульса (СПИ), < 38 м/с) [2] и НМСН II – аксональный вариант, характеризующийся незначительным снижением скорости проведения возбуждения по нервам (СПИ > 38 м/с) [2].

Суммарная частота различных форм амиотрофии Шарко-Мари-Тус по литературным данным варьирует от 1 до 4 на 10 тысяч населения и является самой высокой среди наследственных заболеваний периферической нервной системы [3]. Тип наследования – преимущественно аутосомно-доминантный. Лица, имеющие мутантный ген, имеют 50% риск передачи заболевания потомству.

Несмотря на наличие нескольких подтипов СМТ, обусловленных мутациями в разных генах, их клинические проявления довольно схожи. В то же время возраст дебюта и выраженность симптомов различается даже у носителей одного и того же патологического гена, в том числе в пределах одной семьи [4].

В большинстве случаев первые клинические признаки появляются в детском (подростковом) возрасте, а к 30-40 годам заболевание принимает генерализованную форму, нередко приводящую к утрате работоспособности и инвалидизации пациентов.

СМТ тип 1 (демиелинизирующий вариант) – наиболее частый вариант, на долю которого приходится более 80% всех случаев СМТ. В основе заболевания лежит генетический дефект периферического миелина. Симптомы заболевания обычно проявляются в конце первого (75% случаев), реже – в начале второго десятилетия жизни (10% случаев) [5]. Пенетрантность патологического гена почти полная: заболевание редко остается бессимптомным после 30 лет [6], но часто сопровождается развитием минимально выраженных симптомов. У большинства больных задолго до появления остальных симптомов заболевания формируется полая стопа с молоткообразной деформацией пальцев – стопа Фридрейха [7, 8]. Икроножные мышцы вовлекаются на более поздней стадии. Отмечается выраженная разница в объеме голени и бедер за счет гипотрофии мышц голени. Атрофия мышц предплечий и кистей обычно менее выражена, чем атрофия нижних конечностей, но иногда кисть может деформироваться по типу «когтистой лапы» [9].

На ЭНМГ регистрируется симметричное равномерное снижение скорости проведения возбуждения по всем исследуемым нервам [10, 11].

У части пациентов с СМТ 1 наблюдаются атипичные формы заболевания. Одной из наиболее частых атипичных форм является болезнь Руси-Леви. Описанный как самостоятельное заболевание (промежуточная фор-

ма между невралжной амиотрофией Шарко-Мари-Тус и атаксией Фридрейха), в настоящее время синдром Русси-Леви рассматривается как вариант СМТ 1 [12, 13].

В 1991 году две независимые группы показали, что причиной СМТ 1А типа является дупликация на коротком плече хромосомы 17 в локусе p11.2 [14, 15]. Возникновение мутации при СМТ 1А определяется особенностями

строения «критического» участка области p11.2 хромосомы 17 [16]. Миелиновый ген RMP22 фланкируется высокомолекулярными повторяющимися элементами (СМТ1А-REP) [17], между которыми в мейозе может происходить неравный кроссинговер как результат спаривания ложно ориентированных друг против друга теломерного и центромерного повторов.

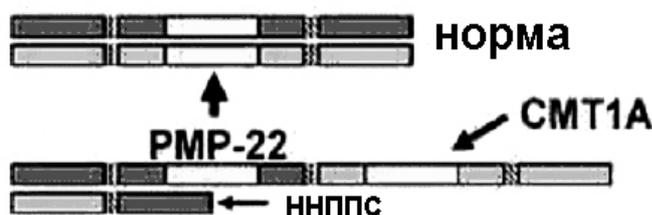


Рис. 1. Механизм неравного кроссинговера с участием гена RMP22. В результате образуются две хромосомы: одна с дупликацией, а вторая с делецией гена RMP22.

В результате образуются две различные аномальные хромосомы: одна из них содержит тандемную дупликацию области длиной 1,5 Мб, другая – делецию той же области, причем область хромосомной перестройки захватывает миелиновый ген RMP22. Наследование гамет с дупликацией, в результате которой увеличивается доза гена RMP22, приводит к развитию СМТ1А [18, 19]. Этот генетический дефект обнаруживают примерно в 70% семей с СМТ 1 типа, причем примерно в 30% случаев он возникает *de novo*. Дупликация наиболее часто происходит на хромосоме, полученной от отца, чем от матери (соответственно в 89% и 11% случаев) [20]. Соотношение мужчин и женщин с СМТ 1А

примерно равно. Делеция гена (т.е. снижение дозы гена RMP22) лежит в основе развития наследственной невропатии с предрасположенностью к параличам от сдавления [21]. Таким образом, результатом одного и того же мутационного события, обусловленного разнонаправленными нарушениями дозы гена RMP22 (делеция или дупликация), являются два различных неврологических заболевания.

Очень редко причиной СМТ1А могут быть точечные мутации в гене RMP22, которые ассоциированы с более тяжелым фенотипом [22]. Это подтверждает тот факт, что изменения именно в этом гене являются причиной возникновения заболевания.

Материалы и методы

ДНК-диагностика проводилась пациентам с предположительным клиническим диагнозом НМЗ, СМТ, синдром Русси-Леви, а также пациентам, у которых была исключена атаксия Фридрейха, направленным в медико-генетическую службу Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя». Всего обследовано 414 человек (238 пробандов и 176 членов их семей). Материалом для

исследования являлась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови пробандов, а также членов их семей. При проведении пренатальной диагностики в качестве биологического материала плода были использованы клетки амниотической жидкости, полученные методом амниоцентеза, сделанного на 16 неделе беременности.

Для идентификации дупликации в гене

RMP22 использовали технологию количественного определения аллелей внутрилокусных микросателлитных маркеров, позволяющую выявлять дополнительную копию гена RMP22 по наличию трех аллелей маркеров, различающихся по числу динуклеотидных или тетра-нуклеотидных повторов [23]. В качестве ДНК-маркеров использовали микросателлитные последовательности D17S2218,

D17S2220, D17S2223, D17S2226 и D17S2229. Анализ проводили методом мультиплексной ПЦР [24]. Продукты ПЦР анализировали с помощью автоматического капиллярного электрофореза в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Обработку данных и определение аллелей выполняли с помощью пакета компьютерной программы GENESCAN (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

Всего обследовано 414 человек. Дупликация гена RMP22, являющаяся причиной невралной амиотрофии Шарко-Мари-Тус тип 1А, была обнаружена у 65 человек: 37 пробандов и 28 членов их семей. Из 65 человек у 34 человек предварительно клинически был поставлен диагноз СМТ, у 8 человек – диагноз синдром Русси-Леви, у 15 человек – НМЗ (нервно-мышечное заболевание) и у 8 человек – атаксия Фридрейха. У всех трех пациентов с *de novo* дупликацией клинически

был поставлен диагноз болезнь Русси-Леви.

Как видно из таблицы 1, 60 человек (92,31%) были информативны как минимум по одному ДНК-маркеру. У 5 человек (7,69%) мутация была выявлена по наличию на электрофореграмме дозового эффекта – двойного по интенсивности сигнала совпадающих по размеру аллелей по отношению к интенсивности сигнала третьего аллеля. У 51 человека (78,47%) были информативны два и более маркера.

Таблица 1

Количество пациентов с дупликацией, у которых были идентифицированы три аллеля в одном и более маркерах

	1 маркер	2 маркера	3 маркера	4 маркера	5 маркеров	дозовый эффект	всего
человек	9	19	18	13	1	5	65
процентов	13,84	29,23	27,7	20	1,54	7,69	100

В таблице 2 представлена информативность каждого из использованных маркеров относительно общего числа выявленных дупликаций.

Таблица 2

Информативность маркеров у пациентов, имеющих дупликацию гена RMP22

Маркер	Количество выявленных дупликаций	Информативность маркера
D17S2218	31/65	47,7%
D17S2220	51/65	78,5%
D17S2223	24/65	36,9%
D17S2226	22/65	33,8%
D17S2229	30/65	46,2%

Соотношение мужчин и женщин с СМТ 1А в нашей выборке примерно одинаково и составляет 31 и 34 человека соответственно. В 22 случаях заболевание имело унаследованный характер, в трех случаях обнаружена *de novo*

дупликация, в 12 случаях природа возникновения мутации не была установлена из-за невозможности обследования родственников пробандов.

Мы проследили передачу патологической

хромосомы в трех *de novo* случаях, и у всех трех пробандов дублицированная хромосома имела отцовское происхождение. Это подтверждает литературные данные о наиболее частом происхождении дупликации на хромосоме, полученной от отца, чем от матери. *De novo* дупликация представлена на рисунке 2. У пробанда было выявлено три копии маркера D17S2229. Маркеры D17S2223 и D17S2218 имеют по два аллеля одинакового размера, что дает двойной по ин-

тенсивности сигнал по отношению к третьему аллелю (соотношение высоты пиков более чем 1,8:1 для маркера D17S2223 и менее чем 0,65:1 для маркера D17S2218). У обоих родителей выявлено по два аллеля каждого из маркеров, что указывает на нормальный генотип. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у пробанда *de novo* дупликации гена PMP22 и подтверждают диагноз невральной амиотрофии Шарко-Мари-Тус тип 1А.

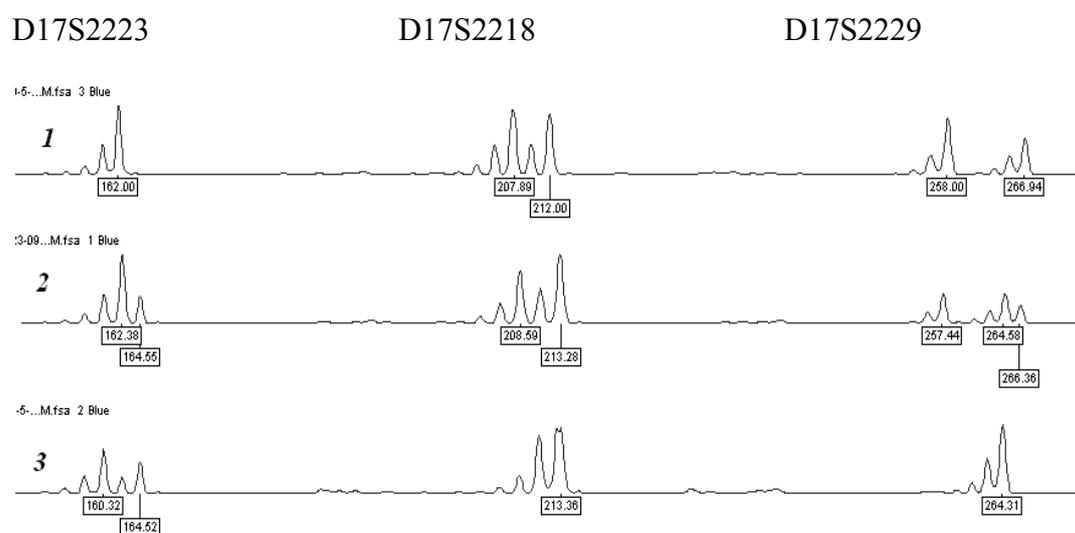


Рис. 2. Генотипы членов семьи с дупликацией *de novo* у пробанда: 1 – отец пробанда; 2 – пробанд, дозовый эффект по маркерам D17S2223 и D17S2218; 3 – мать пробанда.

Пренатальная диагностика невральной амиотрофии Шарко-Мари-Тус тип 1А.

Пренатальная диагностика была проведена в одной семье, в которой ранее была диагностирована СМТ1А.

Молекулярно-генетический анализ ДНК плода был рекомендован женщине 33 лет, у мужа которой была выявлена дупликация гена

PMP22. По результатам ДНК-анализа у плода идентифицировано два нормальных аллеля по каждому из маркеров, что доказывало отсутствие у него СМТ1А.

Это первый случай пренатальной диагностики СМТ1А, проведенной с использованием методов ДНК-анализа позволившей гарантированно исключить патологию плода.

Заключение

Применение молекулярно-генетических методов позволяет не только проводить точную диагностику имеющейся патологии, но и способствует улучшению ранней клинической диагностики. В свою очередь, более точная постановка клинического диагноза позволяет установить генетическую природу заболевания в этих семьях с большей эффективностью. Раз-

работанный протокол диагностики невральной амиотрофии Шарко-Мари-Тус тип 1А, используемый в лабораторной клинической диагностике, обладает высокой точностью и информативностью (97-99%), а одновременный анализ трех высокополиморфных ДНК-маркеров локуса p11.2 хромосомы 17 повышает эффективность, сокращая время анализа и снижая его себестоимость.

Список использованных источников

1. Vance J.M. Hereditary motor and sensory neuropathies / J.M. Vance // J. Med. Genet. – 1991. – Vol. 28. – P. 1-5.
2. Harding, A.E. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II / A.E. Harding, P.K. Thomas // Brain. – 1980. – Vol. 103. – P. 259-280.
3. Emery A.E.H. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey/ A.E. Emery // Neuromusc. Disord. – 1991. – Vol. 1. – P. 19-29.
4. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication / P.K. Thomas [et al.] // Brain. – 1997. – Vol. 120. – P. 465-478.
5. Левин О.С. Наследственные полиневропатии / О.С. Левин // Полиневропатии / О.С. Левин. – М., – 2006. – Гл. 10. – С. 357-391.
6. Bird T.D. Charcot-Marie-Tooth disease: data for genetic counseling relating age to risk / T.D. Bird, G.H. Kraft // Clin. Genet. – 1978. – Vol. 14. – P. 43-49.
7. Dubowitz V. Disorders of the lower motor neurone hereditary motor neuropathies / V. Dubowitz // Muscle disorders in childhood / V. Dubowitz. – W.B. Saunders company LTD, 1995. – 2nd edition. – Ch. 9. – P. 370-386.
8. Болезни нервной системы. Под ред. Яхно Н.Н., Штульмана Д.Р. // М., Медицина. – 2001. – С. 500-506.
9. Sarnat H.B. Neuromuscular disorders / H.B. Sarnat // Textbook of pediatrics / W.E. Nelson [et al.]; ed. W.E. Nelson. – 15th edition. – W.B. Saunders company, 1997. – P. 1758-1759.
10. Charcot-Marie-Tooth disease 1A with 17p1.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases / N. Birouk [et al.] // Brain. – 1997. – Vol. 120. – P. 813-823.
11. Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A / K.M. Krajewski [et al.] // Brain. – 2000. – Vol. 123. – P. 1516-1527.
12. Harding A.E. From the syndrome of Charcot, Marie and Tooth to disorders of peripheral myelin proteins / A.E. Harding // Brain. – 1995. – Vol. 118. – P. 809-818.
13. Roussy-Levy syndrome is a phenotypic variant of Charcot-Marie-Tooth syndrome IA associated with a duplication on chromosome 17p11.2. / M. Auer-Grumbach [et al.] // J. Neurol. Sci. – 1998. – Vol. 154. – P. 72-75.
14. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A / J.R. Lupski [et al.] // Cell. – 1991. – Vol. 66. – P. 219-232.
15. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a) / P. Raeymaekers [et al.] // Neuromusc. Disord. – 1991. – Vol. 1. – P. 93-97.
16. Estimation of the size of the chromosome 17p11.2 duplication in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a) / P. Raeymaekers [et al.] // J. Med. Genet. – 1992. – Vol. 29. – P. 5-11.
17. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit / L. Pentao [et al.] // Nat. Genet. – 1992. – Vol. 2. – P. 292-300.
18. The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A / P.I. Patel [et al.] // Nature Genet. – 1992. – Vol. 1. – P. 159-165.
19. The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1a / L.J. Valentijn [et al.] // Nat. Genet. – 1992. – Vol. 1. – P. 166-170.
20. Origin of the de novo duplication in Charcot-Marie-Tooth disease type IA: unequal nonsister chromatid exchange during spermatogenesis / F. Palau [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 1993. – Vol. 2. – P. 2031-2035.
21. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies / P.F. Chance [et al.] // Cell. – 1993. – Vol. 72. – P. 143-151.
22. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A – association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene / B.B. Roa [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1993. – Vol. 329, № 2. – P. 96-101.
23. New polymorphic short tandem repeats for PCR-based Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication diagnosis / J.L. Badano [et al.] // Clin. Chem. – 2001. – Vol. 47, № 5. – P. 838-843.
24. Осадчук Т.В. Определение и оценка информативности внутрилокусных микросателлитных маркеров для диагностики невралжной амиотрофии Шарко-Мари-Тус 1А типа / Т.В. Осадчук, К.А. Моссэ // Вести АН РБ, мед. серия. – 2008. – №3. – С. 18-22.

Дата поступления статьи 15 сентября 2009 г.

ЭФФЕКТ ПОВЫШЕННОЙ ДОЗЫ ГЕНОВ *CRT*-КЛАСТЕРА В ПРОДУКЦИИ КАРОТИНОИДНЫХ ПИГМЕНТОВ ШТАММАМИ *PANTOEA AGGLOMERANS*

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, г. Минск,

²Белорусский государственный университет, пр-т Независимости, 4, г. Минск.

Введение

Благодаря своим полезным свойствам каротиноиды находят применение в различных сферах деятельности человека. Данные пигменты используют как витаминные препараты, пищевые добавки для животных, а также как антиоксиданты и пищевые красители. Широкое применение каротиноидов приводит к ежегодному росту объемов их использования. По оценкам специалистов мировой объем продаж каротиноидов в 1996 году составил приблизительно 500 миллионов долларов США, а в 1998 году эта цифра составляла уже 800 миллионов долларов США [1]. Приведенные цифры свидетельствуют о все возрастающем спросе на эти вещества и увеличении глобального рынка каротиноидов.

В живой природе каротиноиды синтезируются различными организмами в том числе и некоторыми бактериями. Например, бактерии *Pantoea agglomerans* способны синтезировать каротиноиды и накапливать в клетках зеаксантин в гликозилированной форме [2]. Однако продуктивность данных бактерий недостаточно высокая для их промышленного использования. В последнее время сделаны важные открытия в расшифровке структуры генов, обеспечивающих синтез каротиноидов (*crt*-генов) [3], а также изучены некоторые особенности функционирования и регуляции данных генов [4]. Клонирование генов биосинтеза каротиноидов *P. agglomerans* в *E. coli* [5] позволило наработать арсенал способов для увеличения выхода каро-

тиноидных пигментов. В частности установлено, что дополнительная экспрессия гена геранилгеранилпирофосфат синтетазы приводила к увеличению синтеза астаксантина в клетках *E. coli* [6], а более эффективная экспрессия генов фитоиндегидрогеназы и ликопинциклазы повышала выход β -каротина в *E. coli* [7]. Несмотря на усилия, предпринятые для увеличения выхода пигментов, продукцию каротиноидов штаммами *E. coli* не удалось повысить до уровня приемлемого для промышленного использования. Бактерии *P. agglomerans* обладают естественно способностью накапливать каротиноиды и, предположительно, могут быть более эффективными продуцентами данных пигментов, чем *E. coli* [4]. Поэтому подходы, которые применяли для увеличения продуктивности *E. coli* могут дать лучший эффект для *P. agglomerans*. Цель работы состояла в увеличении дозы генов геранилгеранилпирофосфат синтетазы (*crtE*), фитоин синтетазы (*crtB*) и фитоиндегидрогеназы (*crtI*) для увеличения продуктивности штаммов *P. agglomerans*. Указанные гены входят в состав *crt*-кластера *P. agglomerans* и их продуктами являются ферменты, относящиеся к начальной стадии биосинтеза каротиноидов. Они катализируют последовательные биохимические реакции, продуктом которых является ликопин. Это вещество является каротиноидом, содержащим 40 углеродных атомов, и последующие биохимические реакции связаны с модификацией концевых участков данной молекулы.

Материалы и методы

В качестве источника генов *crt*-кластера *P. agglomerans* 206 использовали плазмиды

pUC18/1A и pUC18/1-31. Данные плазмиды сконструированы на основе вектора pUC18 и

несут гены биосинтеза каротиноидов бактерий *P. agglomerans* 206 [4].

Выделение плазмидной ДНК в данной работе осуществляли по методике щелочного лизиса [8], а рестрикционный анализ проводили с использованием рестрикционных эндонуклеаз *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Pst*I, *Not*I, *Sac*I, *Sma*I, *Xho*I.

Плазмиды вводили в бактериальные клетки посредством трансформации по методике с использованием холодного раствора 0,1M CaCl₂ как описано в [8] с некоторыми модификациями. Высев трансформантов осуществляли на полноценную плотную питательную среду с ампициллином (25 мкг/мл). Отобранные после трансформации клоны проверяли на наличие в плазмиде вставки нужного размера. Проверку проводили с помощью реакций рестрикции с последующим разделением продуктов гидролиза молекул ДНК при помощи электрофореза. В работе использовали метод горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле с использованием ТАЕ-буфера [8].

Для построения рестрикционной карты плазмиду обрабатывали эндонуклеазами, сайты которых планировали картировать. В экспериментах также использовали совместное расщепление плазмидной ДНК двумя рестрицирующими эндонуклеазами для определения положения сайтов друг относительно друга. При помощи гель-электрофореза определяли размеры фрагментов ДНК, образующихся в результате рестрикции, посредством сравнения этих фрагментов с молекулярными маркерами. В качестве молекулярных маркеров в работе использовали ДНК бактериофага λ, рестрицированную *Hind*III и *Eco*RI на фрагменты известных размеров.

Субклонирование ДНК-фрагментов, образующихся в результате реакции рестрикции, проводили в плазмидный вектор pUC18. Для этого из агарозного геля выделяли фрагменты необходимого размера и смешивали с вектором pUC18, предварительно обработанным той же рестриктазой, которая использовалась для расщепления целевого фрагмента, и проводили лигирование. Для лигирования ДНК использовали

T4 ДНК-лигазу и соответствующий буфер фирмы Fermentas. Реакцию лигирования проводили в течение 12 часов при температуре 16°C.

Для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля использовали набор реактивов и колонки GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit фирмы Amersham Biosciences (США).

Для определения нуклеотидной последовательности проводили секвенирующие реакции с использованием набора реактивов CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit фирмы Fermentas (Литва), содержащих термостабильную Reader™ Taq ДНК-полимеразу, а также праймеры к полилинкеру плазмиды pUC18. Для анализирующего электрофореза использовали гель марки ReproGel™ фирмы Amersham, который полимеризовали посредством экспонирования в УФ-свете (использовали ReproSet™ – Amersham) в течение 10 минут. Электрофорез продуктов секвенирующих реакций проводили в 0,5 X ТБЕ буфере при 1500 В, 60 мА и температуре 55°C. Результаты гель-электрофореза анализировали на автоматическом анализаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) с использованием программного обеспечения ALFwin Sequence Analyser 2.10. Сопоставление полученных нами последовательностей с данными, содержащимися в электронных базах данных, осуществляли с использованием ресурса <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> при помощи пакета программ BLAST.

Для количественного определения каротиноидов бактериальные штаммы, содержащие плазмиды с генами *crt*-кластера, выращивали в течение 24 ч при температуре 28°C и аэрации (180 об/мин) в LB бульоне, содержащем 25 мкг/мл ампициллина. Клетки из 8 мл культуры осаждали центрифугированием и экстракцию пигментов проводили 4 мл смеси метанол-хлороформ (2:1) в течение 40-60 мин [5]. После чего измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 461 нм. Параллельно с выделением каротиноидов проводили определение белка по методу Брэдфорда [9]. Продукцию каротиноидов выражали в количестве мкг пигмента на 1 мг общего клеточного белка.

Результаты и их обсуждение

Для повышения дозы генов *crtB*, *crtE* и *crtI* ставили задачу создания генетических конструкций, несущих указанные гены. Для

этого планировали выделить данные гены из плазмид pUC18/1A или pUC18/1-31. Данные плазмиды несут достаточно протяженную

вставку хромосомной ДНК *P. agglomerans* 206 [10] и точная локализация указанных генов не известна. Поэтому произвели субклонирование плазмиды pUC18/1-31, т.е. создали клонотеку из 7 клонов, включающую фрагменты ДНК *crt*-кластера бактерий

P. agglomerans 206 с размером субклонированного фрагмента от 0,4 до 2 т.п.н. (табл. 1). Определение нуклеотидной последовательности субклонированных фрагментов позволило локализовать интересующие нас гены (табл. 1).

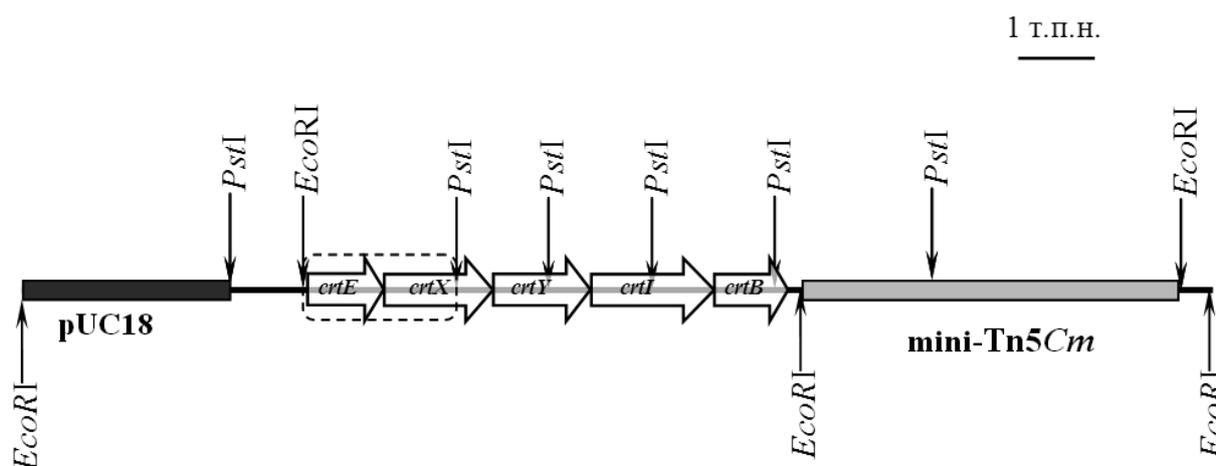
Таблица 1

Плазмиды, несущие субклонированные фрагменты pUC18/1-31

№ п/п	Плазида	Размер фрагмента хромосомной ДНК из <i>P. agglomerans</i> , т.п.н.	Гены <i>crt</i> -кластера, с которыми обнаружена идентичность
1	№5	1,1	<i>crtB</i> , <i>crtZ</i>
2	E2-f	1	не обнаружено
3	ра	0,7	<i>crtB</i> , <i>crtI</i>
4	рγ	2	<i>crtE</i> , <i>crtX</i>
5	рτ	1,3	<i>crtI</i> , <i>crtY</i>
6	ρω	1,2	<i>crtY</i> , <i>crtX</i>
7	№22	0,4	<i>crtZ</i>

В результате анализа полученной нуклеотидной последовательности *crt*-кластера и сопоставления данной информации с данными рестрикционного картирования плазмиды pUC18/1-31 [4] определили, что ген *crtE* содержится в *EcoRI* – *PstI* фрагменте размером около 2 т.п.н., а ген *crtB* в *PstI* – *EcoRI* фрагменте размером около 1,7 т.п.н. (рис. 1). Как видно из таблицы 1 плазида рγ, которая является

субклоном pUC18/1-31, содержит полноразмерный ген *crtE*. Поэтому рγ (pUC-*crtE*) потенциально может быть использована в качестве генетической конструкции для увеличения дозы гена геранилгеранилпирофосфат синтазы (рис. 1). Последовательность гена *crtB* при создании клонотеки *crt*-кластера оказалась разделенной в субклоны р№5 и ра, а *crtI* – в субклоны ра и рτ (табл. 1).

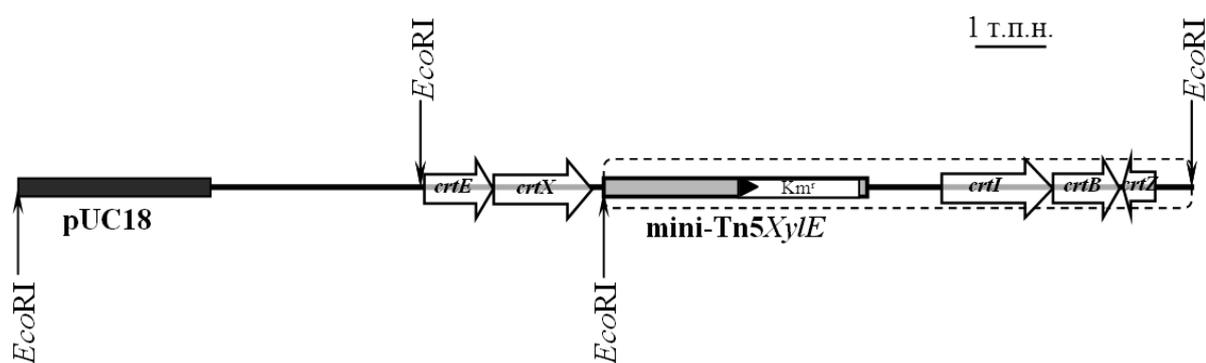


Ген *crtZ* инактивирован вставкой транспозона mini-Tn5Cm, поэтому на рисунке не указан. Пунктиром обозначен участок *crt*-кластера, который использовали для создания плазмиды pUC-*crtE*.

Рис. 1. Рестрикционная карта плазмиды pUC18/1-31 (указаны только сайты ферментов *EcoRI* и *PstI*).

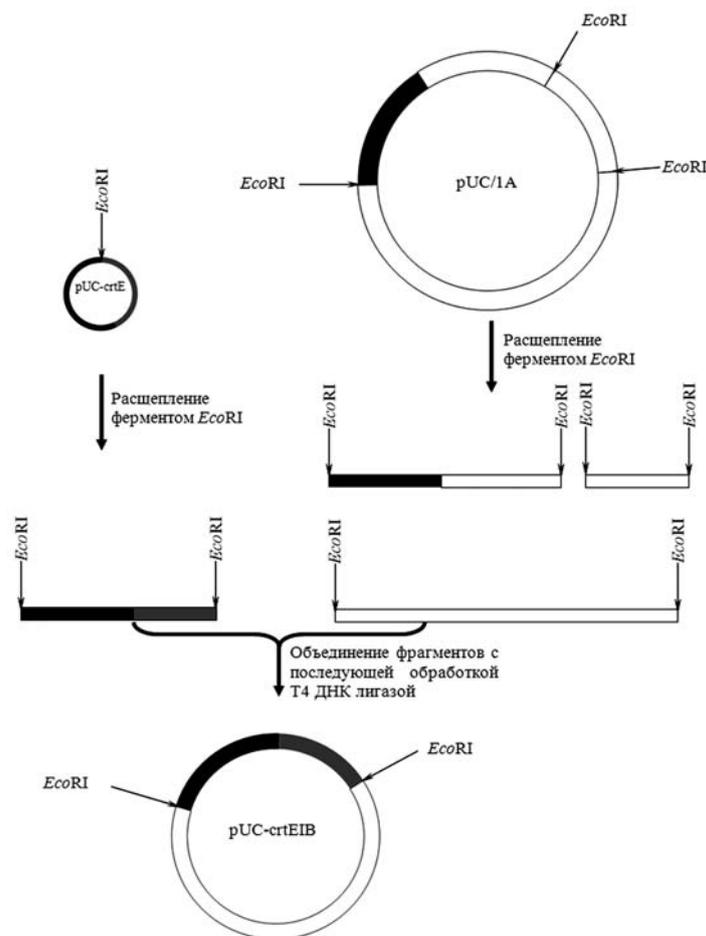
Задача создания плазмиды, экспрессирующей гены *crtB* и *crtI*, не может быть решена клонированием соответствующих фрагментов плазмиды pUC18/1-31, хотя бы эти фрагменты и содержат полноразмерные гены. Для функционирования генетических конструкций необходимы промоторные области, обеспечивающие транскрипцию генов, поэтому наличие полноразмерных генов еще не гарантирует функциональность конструкции. Плазмида pUC-crtE содержит *crtE*, который является первым геном одного из оперонов *crt*-кластера и поэтому имеет промоторную область. При ферментативном гидролизе плазмиды pUC18/1-31 эндонуклеазами *EcoRI* и *PstI* образуется фрагмент *crt*-кластера, содержащий ген *crtE* с регуляторной областью, поэтому велика вероятность, что плазмида pUC-crtE содержит функционирующий *crtE*. В качестве источника *crtB* и *crtI* использовали плазмиду pUC18/1A [10]. При анализе рестрикционной карты плазмиды pUC18/1A (рис. 2) и сопоставлении данных локализации места инсерции транспозона [4] установили, что при обработке эндонуклеазой *EcoRI* образуется три фрагмента. Фрагмент размером 5,6 т.п.н. (содержит в своем составе плазмиду pUC18 и фрагмент бактериальной ДНК фланкирующий *crt*-кластер), около 2,5 т.п.н. (содержит фрагмент *crt*-кластера с генами *crtE*, *crtX* и начальный фрагмент *crtY*)

и участок ДНК размером 8,3 т.п.н., содержащий концевой фрагмент *crtY*-гена, минитранспозон, гены *crtI* и *crtB* (рис. 2). Фрагмент размером 8,3 т.п.н. клонировали в pUC-crtE. Для этого плазмиду pUC-crtE расщепляли посредством гидролиза эндорестриктазой *EcoRI* (рис. 3), полученную молекулу ДНК лигировали с фрагментом *crt*-кластера размером 8,3 т.п.н. из плазмиды pUC18/1A (рис. 3). Полученную конструкцию обозначили pUC-crtE1B. При введении данной плазмиды в клетки *E. coli* XL1-blue бактерии приобретали признак розовой окраски колоний, что является следствием накопления ликопина в клетках. Данный факт свидетельствует о функционировании генов *crtB*, *crtE* и *crtI*. Из чего следует, что плазмида pUC-crtE несет функционирующий *crtE*, и может быть использована для увеличения дозы данного гена. Также можно сделать вывод, что фрагмент *EcoRI* – *EcoRI* плазмиды pUC18/1A размером 8,3 т.п.н. несет функциональные *crtB* и *crtI* гены. Видимо, транскрипция данных генов происходит с промотора внутри минитранспозона (рис.2). Для создания генетической конструкции, несущей функциональные *crtB* и *crtI* гены указанный *EcoRI* – *EcoRI* фрагмент плазмиды pUC18/1A клонировали в вектор pUC18. Полученную плазмиду обозначили pUC-crt1B.



Ген *crtY* инактивирован вставкой транспозона mini-Tn5XylE, поэтому на рисунке не указан. Пунктиром обозначен участок плазмиды, который использовали для создания плазмиды pUC-crt1B. Черным треугольником внутри транспозона mini-Tn5XylE обозначен промотор, который обеспечивает транскрипцию гена устойчивости к канамицину.

Рис. 2. Рестрикционная карта плазмиды pUC18/1A (указаны только сайты фермента *EcoRI*).

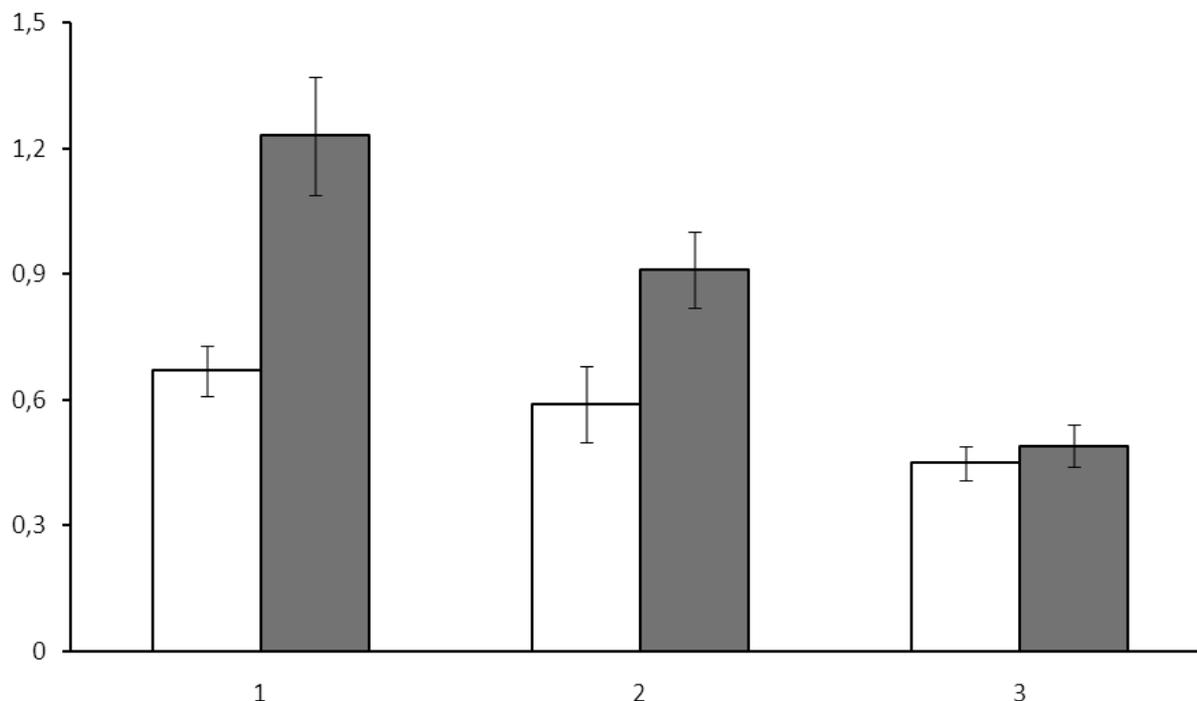


Черным цветом показан вектор pUC18, серым цветом обозначен фрагмент *crt*-кластера, несущий ген *crtE*, белым – фрагмент *crt*-кластера, несущий гены *crtI* и *crtB*.

Рис. 3. Схема конструирования плазмиды pUC-crtEIB.

Плазмиды pUC-crtE и pUC-crtIB посредством трансформации вводили в клетки бактерий *P. agglomerans* 206, *P. agglomerans* 206crtZ и *P. agglomerans* 1'. В результате был получен ряд штаммов, обозначенных *P. agglomerans* 206 - pUC-crtE, *P. agglomerans* 206crtZ - pUC-crtE, *P. agglomerans* 1' - pUC-crtE и *P. agglomerans* 206 - pUC-crtIB, *P. agglomerans* 206crtZ - pUC-crtIB, *P. agglomerans* 1' - pUC-crtIB, соответственно. У полученных штаммов определяли содержание каротиноидных пигментов и общего клеточного белка, результаты измерения представлены на рис. 4 и рис. 5. Как видно из рис. 4, введение дополнительных копий гена геранилгеранилпирофосфат синтетазы в штамм *P. agglomer-*

ans 206 вызывало увеличение продуктивности данного штамма приблизительно на 80%. Для штамма *P. agglomerans* 206crtZ рост продуктивности был меньшим и составил примерно 50%. Введение дополнительной копии *crtE*-гена в штамм *P. agglomerans* 1' незначительно увеличивало выход пигмента. При введении в штамм *P. agglomerans* 206 плазмиды с генами фитоин синтетазы и фитоин дегидрогеназы его продуктивность увеличивалась приблизительно на 30% (рис. 5). Для штамма *P. agglomerans* 206crtZ - pUC-crtIB также было отмечено небольшое, порядка 20%, увеличение продуктивности. Для *P. agglomerans* 1' - pUC-crtIB отмечалось снижение содержания ликопина по сравнению с *P. agglomerans* 1' (рис. 5).

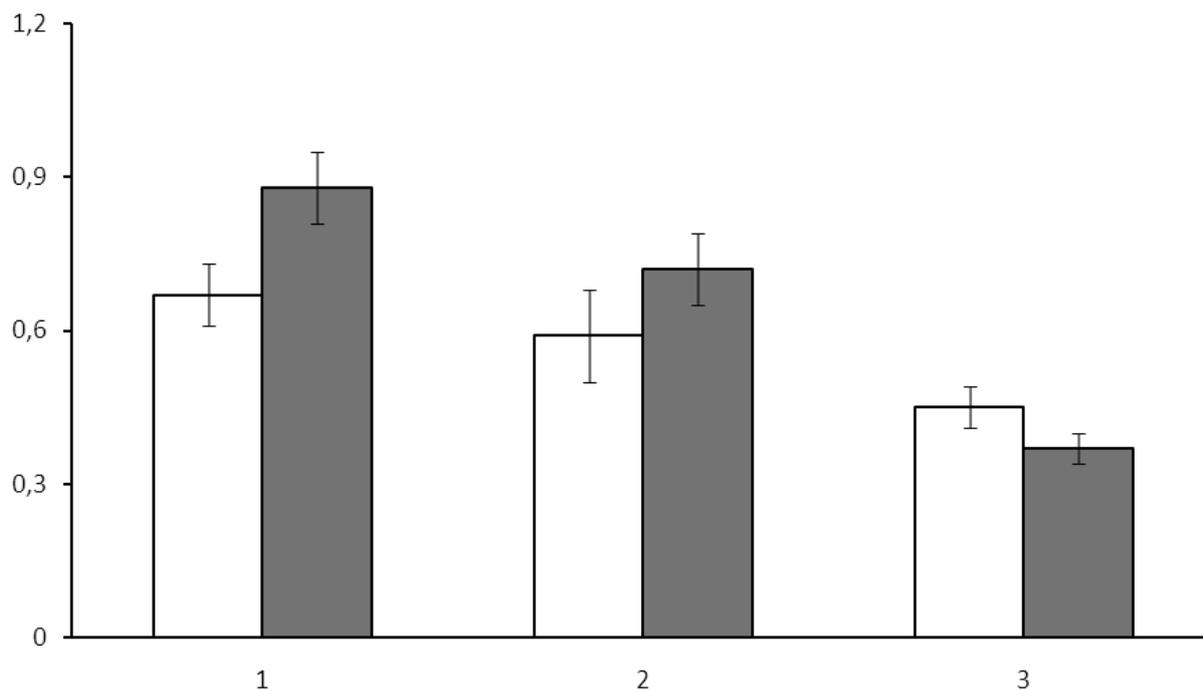


1 – *P. agglomerans* 206, 2 – *P. agglomerans* 206*crtZ*, 3 – *P. agglomerans* 1'. Серым цветом обозначены штаммы, несущие дополнительную копию гена *crtE* на плазмиде, белым цветом – штаммы, не имеющие плазмиды.

Рис. 4. Уровень продукции каротиноидных пигментов (мкг/мг белка) штаммами *P. agglomerans*, синтезирующими различные каротиноидные пигменты.

Влияние повышенной дозы гена геранилгеранилпирофосфат синтетазы нельзя оценить однозначно, в разных штаммах эффект от введения дополнительной копии *crtE*-гена был разным. Еще сложнее оценить влияния повышение копийности двух других генов. Фактор копийности генов *crtB* и *crtI* имел положительное влияние на продуктивность *P. agglomerans* 206 – pUC-*crtIB* и *P. agglomerans* 206*crtZ* – pUC-*crtIB* штаммов, а на продуктивность *P. agglomerans* 1' - pUC-*crtIB* дополнительная экспрессия *crtB* и *crtI* сказывалась негативно (рис. 5, табл. 2). Такой эффект, вероятно, связан с особенностями использованных в работе штаммов. *P. agglomerans* 206*crtZ* и *P. agglomerans* 1' являются производными *P. agglomerans* 206 и получены путем инсерционного мутагенеза. Глав-

ным отличием производных штаммов является измененный состав конечных продуктов биосинтеза каротиноидов. Для дикого типа – *P. agglomerans* 206 – конечным каротиноидом является ди- и моногликозилированные производные зеаксантина. Инсерция транспозона mini-Tn5*Cm* в ген *crtZ* в случае штамма *P. agglomerans* 206*crtZ* приводит к инактивации этого гена и невозможности образования функционального продукта, которым является β -каротин гидроксилаза. В результате этого *P. agglomerans* 206*crtZ* накапливают β -каротин [4, 10]. Для штамма *P. agglomerans* 1' конечным каротиноидом является ликопин, что является результатом инактивации гена ликопин циклазы (*crtY*). Данный ген инактивирован посредством инсерции транспозона mini-Tn5*xylE* [4, 10].



1 – *P. agglomerans* 206, 2 – *P. agglomerans* 206crtZ, 3 – *P. agglomerans* 1'. Серым цветом обозначены штаммы, несущие дополнительную копию генов *crtI* и *crtB* на плазмиде, белым цветом – штаммы, не имеющие плазмиды.

Рис. 5. Уровень продукции каротиноидных пигментов (мкг/мг белка) различными штаммами *P. agglomerans*.

Продуктивность инсерционных мутантов несколько ниже по сравнению с исходным штаммом. *P. agglomerans* 206crtZ накапливают приблизительно на 10%, а *P. agglomerans* 1' примерно на 30% меньше пигмента, чем *P. agglomerans* 206 (рис. 4), т.е. изменение конечного продукта биосинтетического пути приводит к снижению продуктивности бактериальных штаммов. Можно предположить, что химическая структура пигмента, являющегося конечным продуктом биосинтеза, является одним из факторов, определяющих продуктивность штамма. Штаммы, продуцирующие зеаксантин и β-каротин обладают большим потенциалом для увеличения продуктивности по сравнению со штаммами, продуцирующими ликопин. Видимо, это связано с тем, что эффективность накопления пигментов уменьшается в ряду: зеаксантин – β-каротин – ликопин.

При сравнении конструкций pUC-crtE и

pUC-crtIB между собой (табл. 2) видно, что повышение дозы гена геранилгеранилпирофосфат синтетазы эффективнее увеличивает продуктивность штаммов, синтезирующих каротиноидные пигменты, по сравнению с генами фитоинсинтетазы и фитоин дегидрогеназы. Данный факт можно объяснить тем, что геранилгеранилпирофосфат синтетазы является ферментом, катализирующим более раннюю реакцию биохимической цепочки синтеза каротиноидов, поэтому более эффективно влияет на продуктивность. Фитоинсинтаза – фермент, субстратом которого является геранилгеранилпирофосфат. Эффективность работы этого фермента определяется наличием субстрата, который продуцируется геранилгеранилпирофосфат синтетазой, т.е. эффективность работы CrtV зависит от экспрессии *crtE*. В свою очередь фитоин дегидрогеназа в качестве субстрата использует фитоин, который синтезируется продуктом гена *crtB*.

Таблица 2

Влияние дополнительной копии генов *crtB*, *crtE* и *crtI* на продукцию каротиноидов бактериальными штаммами

Штамм	Конечный продукт синтеза каротиноидов	Продуктивность штаммов с дополнительной копией генов	
		<i>crtE</i>	<i>crtB</i> , <i>crtI</i>
<i>P. agglomerans</i> 206	зеаксантина ди- и моногликозид	+ 80%	+ 30%
<i>P. agglomerans</i> 206 <i>crtZ</i>	β-каротин	+ 50%	+ 20%
<i>P. agglomerans</i> 1'	ликопин	+ 8%	- 20%

Заключение

Для бактерий *P. agglomerans*, накапливающих зеаксантин-гликозиды, наличие плазмиды с дополнительной копией *crtE* гена увеличивает продуктивность штамма на 80%, а повышение дозы *crtB* и *crtI* – на 30%. Для бактерий, продуцирующих β-каротин, выход пигмента увеличивался на 50% при увеличении дозы *crtE* гена и на 20% при дополнительной экспрессии *crtB* и *crtI*. Введение дополнительной копии *crtE* гена в штамм,

который продуцирует ликопин, существенным образом не повышало продуктивность, и выход пигмента у данного штамма снижался на 20% при увеличении дозы *crtB* и *crtI* генов. Таким образом, увеличение дозы *crtB*, *crtE* и *crtI* генов повышает выход пигмента у зеаксантин и β-каротин синтезирующих бактерий. Продуктивность бактерий синтезирующих ликопин может снижаться при дополнительной экспрессии *crtB* и *crtI*.

Список использованных источников

1. The biotechnological potential and design novel carotenoids gene combination in *Escherichia coli* / Sandmann G. [et al.] // Trends in Biotechnology. – 1999 – Vol. 17, № 6. – P. 233-237.
2. Armstrong, G.A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale / G.A. Armstrong // Annual Review of Microbiology. – 1997. – Vol. 51, № 10. – P. 629-659.
3. Sedkova, N. Diversity of Carotenoid Synthesis Gene Clusters from Environmental Enterobacteriaceae Strains / N.Sedkova, Luan Tao, Pierre E. Rouvière, Qiong Cheng // J Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 12. – P. 8141-8146.
4. Селезнева, Ю. В. Генетический контроль синтеза каротиноидных пигментов у бактерий *Pantoea agglomerans*: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.26 / Ю. В. Селезнева – Мн., 2006. – 114 с.
5. Hundle, B.S. Carotenoids of *Erwinia herbicola* and an *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster / B.S. Hundle [et al.] // Photochem Photobiol. – 1991. – Vol. 54, №1. – P. 89-93.
6. Wang, C.W. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxantin production in *Escherichia coli* / C.W.Wang, M.K.Oh, J.C. Liao // Biotechnology and Bioengineering. – 1999. – Vol. 62, №2. – P. 235-241.
7. Smolk, C.D. Controlling the metabolic flux through the carotenoid pathway using directed mRNA processing and stabilization / C.D. Smolk, V.J.J. Martin, J.D. Keasling // Metab. Eng. – 2001. – Vol. 3, №4. – P. 313-321.
8. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
9. Справочник биохимика / Р. Досон [и др.] – М.: Мир, 1991, – 544 с.
10. Галиновский, Д. В. Клонирование кластера генов биосинтеза каротиноидов бактерий *Pantoea agglomerans* 206 в *E. coli* HB101 / Д. В. Галиновский, Ю. В. Селезнёва, А. Н. Евтушенков // Весці НАН Беларусі Сер. Біялагічных навук 2006. – №5. – С. 40-43.

Дата поступления статьи 16.сентября 2009 г.

С.О. Мясников^{1,2}, Н.Б. Гусина¹, И.В. Наумчик¹, Р.Д. Хмель¹, Н.В. Румянцева¹

ДНК-ДИАГНОСТИКА МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА-БЕКЕРА В БЕЛАРУСИ: АНАЛИЗ ДЕЛЕЦИЙ ЭКЗОНОВ ГЕНА DMD

¹ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», ул. Орловская 66/9, Минск, Республика Беларусь, 220053

² Международный государственный экологический университет им. А.Д.Сахарова, ул. Долгобродская 23, Минск, Республика Беларусь, 220009

Введение

Псевдогипертрофическая мышечная дистрофия или прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна-Бекера (МДДБ) – наиболее частая форма мышечной дистрофии у детей, которая наследуется по X-сцепленному рецессивному типу. Клинически МДДБ разделяют на две формы: мышечную дистрофию Дюшенна (МДД, OMIM #310200), частота которой составляет 1:3500 новорожденных мальчиков, и мышечную дистрофию Бекера (МДБ, OMIM #300376), которая встречается с частотой 1:20000. Первые клинические признаки, типичные для МДД, проявляются в возрасте 3-5-ти лет: неуверенная, «утиная» походка, слабость мышц нижних конечностей, псевдогипертрофия икроножных мышц, поясничный гиперлордоз [1,2]. Мышечная слабость прогрессирует быстро и симметрично по восходящему типу. Средняя продолжительность жизни – 20 лет. Больные умирают от легочной инфекции и/или сердечной недостаточности. У пациентов с МДБ первые клинические признаки проявляются в 12-15 лет. Для данного заболевания характерно относительно доброкачественное течение и сохранность способности к самостоятельной ходьбе на протяжении 15-20 лет от момента проявления симптомов заболевания. При данной форме пациенты доживают до 40-50-ти лет. Женщины, как правило, остаются клинически здоровыми, однако у них могут наблюдаться отдельные субклинические проявления заболевания [1, 2]. Помимо нарушений со стороны опорно-двигательного аппарата, примерно у 20% больных наблюдаются при-

знаки умственной отсталости, у 90% диагностируются нарушения работы сердца [3].

Причина возникновения мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера – мутации в гене DMD (OMIM *300377) расположенном в локусе p21.2 хромосомы X. Это самый крупный из известных на сегодня генов человека, кодирующий белок дистрофин – компонент дистрофин-гликопротеинового комплекса цитоскелета, сохраняющий целостность клеточной мембраны. Существует 8 промоторов, осуществляющих альтернативную специфическую транскрипцию первых экзонов в разных тканях и на разных стадиях эмбрионального развития. Каждый промотор использует свой собственный первый экзон, в результате чего изоформы дистрофина имеют уникальные N-концевые домены. Три из них, расположенные в 5'-области гена, регулируют экспрессию полноразмерных изоформ, представленных в тканях мозга, мышц и клетках Пуркинье. Альтернативные промоторы, расположенные дистальнее, дают начало более коротким изоформам дистрофина сетчатки, клеток мозга, Шванновских клеток и дистрофина общего типа. Мышечный дистрофин – это изоформа белка, обеспечивающего связь между актиновыми филаментами клеток поперечно-полосатой и сердечной мускулатуры [4].

Приблизительно 2/3 всех случаев МДДБ обусловлены крупными делециями экзонов гена DMD различной протяженности, 5-10% случаев – дупликациями экзонов, остальная часть нарушений – точковыми мутациями [5-7]. Примерно 98% всех делеций экзонов ге-

на DMD выявляются в двух участках – область 2-19 и 44-52-го экзонов [4,8].

Цель данной работы – провести анализ

делеций экзонов гена DMD у пациентов с мышечной дистрофией Дюшенна-Бекера в Беларуси.

Материалы и методы исследования

Исследуемая группа представлена 53 пациентами обратившимися в Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» и отобранными по клинико-лабораторным признакам в связи с наличием прогрессирующей мышечной дистрофии в анамнезе. В качестве биологического материала использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [9].

Для выявления делеций Рm/1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 16, 17, 19, 32, 34, 41-45, 47-53 и 60 экзонов гена DMD использовался метод мультиплексной ПЦР (мПЦР). Амплификацию экзонов проводили в следующих мультиплексах: I – экзоны 1, 3, 4, 8, 13 и 19; II - экзоны 6, 42, 43, 44, 45 и 47; III – экзоны 49, 50, 51, 52, 53 и 60; IV – экзоны 16, 32 и 34; V - экзоны 12, 17, 41 и 48. Условия амплификации были модифицированы по сравнению с ранее описанными методами [10-13]: первичная денатурация 94°C, 4 минуты; затем 35 циклов: денатурация: 94°C, 30 секунд; отжиг 54°C, 45

секунд; элонгация 65°C, 2 минуты; конечная элонгация 65°C, 5 минут. Для разделения продуктов мПЦР использовали 9% полиакриламидный гель (29:1) с последующим окрашиванием бромистым этидиумом.

В случае делеции экзона на геле будет отсутствовать соответствующий продукт амплификации. При делеции участка гена из трех или более экзонов должен соблюдаться принцип непрерывности - не может быть экзона внутри делетированного участка.

Во избежание ложноположительных результатов, повторную амплификацию отсутствующего при мПЦР экзона проводили методом классической ПЦР при следующих условиях: первичная денатурация 94°C, 4 минуты; затем 30 циклов: денатурация 94°C, 30 секунд; отжиг 54°C, 30 секунд; элонгация 65°C, 1 минуту; конечная элонгация 65°C, 5 минут. Наличие продукта определяли путем электрофоретического анализа в 1,0% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидиумом.

Результаты и обсуждение

В результате исследований в группе, состоящей из 53 пациентов, делеции выявлены у 21

из них, что составляет 40%. Пример выявления делеций гена DMD приведен на рисунке 1.

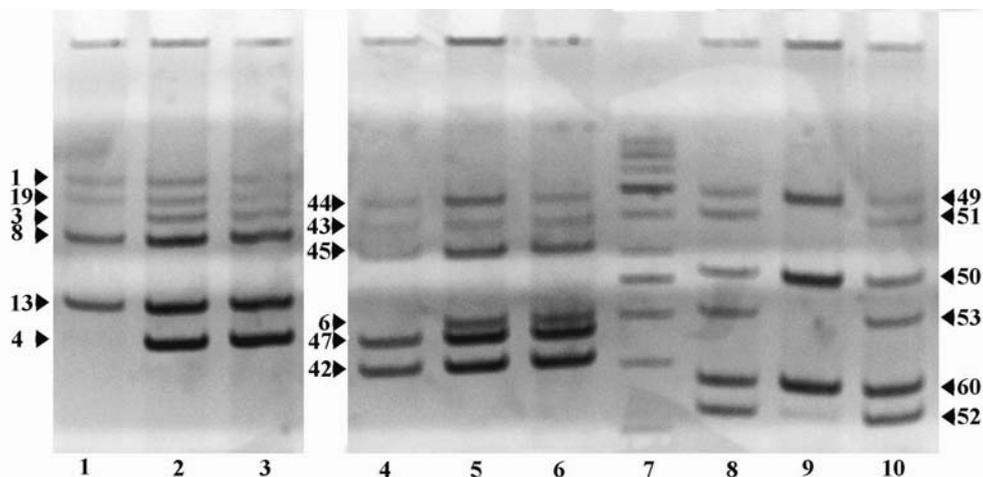


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации мПЦР.

Дорожки 1, 4, 8 – пациент №1; дорожки 2, 5, 9 – пациент №2, дорожки 3, 6, 10 – контрольный образец, 7 - маркер молекулярного веса. Цифрами указаны номера амплифицированных экзонов гена дистрофина. У пациента №1 – делеция 3-го, 4-го и 6-го экзонов, у пациента №2 - делеция 51-го, 52-го и 53-го

экзонов гена DMD. В случае пациента №1, соблюдая принцип непрерывности, мы делаем заключение о том, что 5-й экзон также делетирован.

Делеции экзонов 21-го пробанда схематически представлены на диаграмме, которая отображена на рисунке 2.

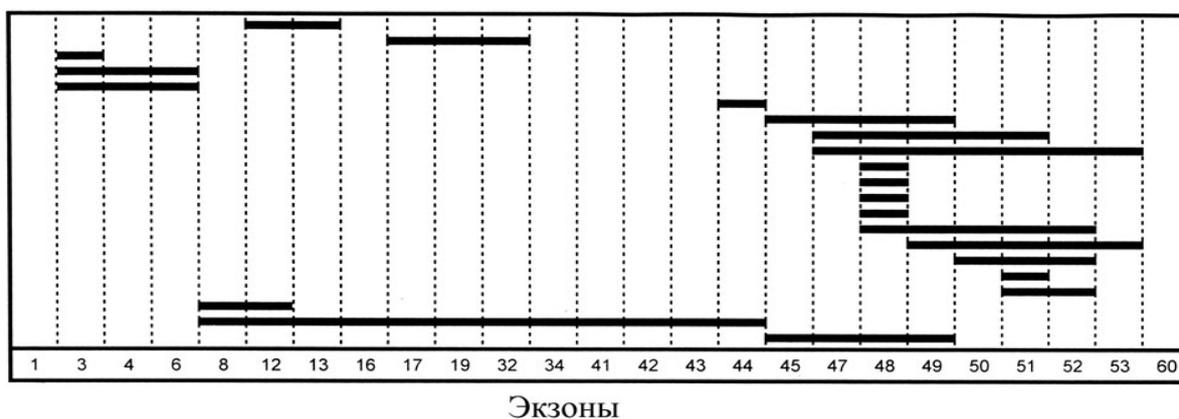


Рис. 2. Схематическая диаграмма делеций экзонов гена DMD у 21-го пробанда.

По результатам работ различных авторов, частота делеций экзонов варьирует и составляет от 31% [14] до 87% [15]. Полученные нами данные о частоте выявления делеций экзонов оказались близкими по значению с результатами полученными исследователями из России, Испании и Японии, о распределении делеций в гене – из Греции, США, Китая и России. Сравнение частот встречаемости делеций экзонов

гена DMD и их распределение в некоторых популяциях представлены в таблице.

По встречаемости наиболее частой оказалась делеция 48 экзона, она была выявлена в 12,5%. Следующие по частоте выявления делеции: 51 экзона – 9,7%, 49 экзона – 8,3%, 50 и 52 экзонов – по 6,9%, 47 и 13 экзона – по 5,6%. Распределение частот встречаемости делеций экзонов гена DMD представлены на рисунке 3.

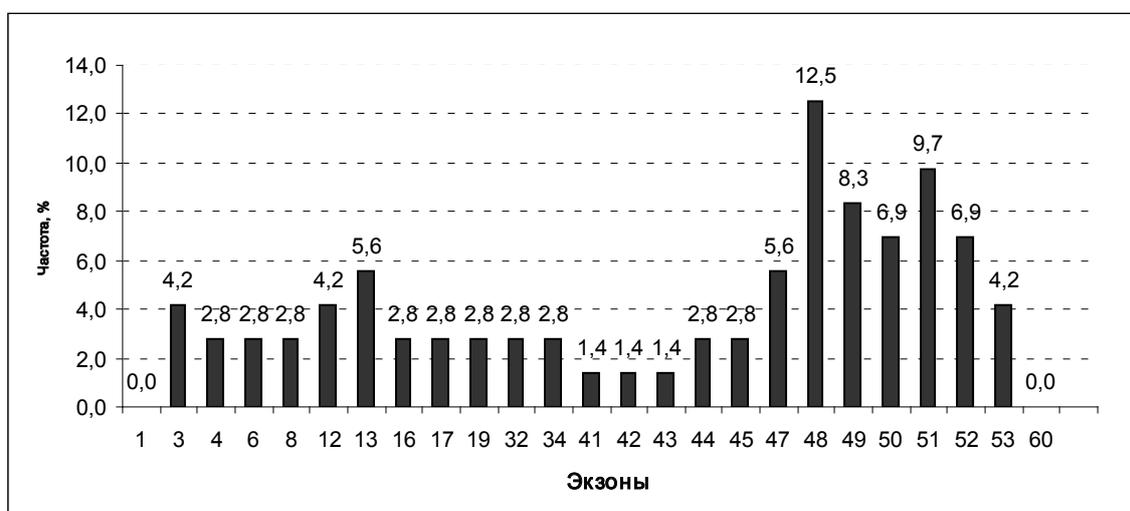


Рис. 3. Частоты встречаемости делеций экзонов гена DMD у белорусских пациентов.

Делеции экзонов в проксимальном участке гена были обнаружены в 29%, в центральном участке – в 67%. У одного пациента обнаружена делеция, затронувшая участок протяженностью с 8-го по 44-й экзон. Делеции одного экзона в проксимальном участке гена выявлены в 5% слу-

чаев, делеции нескольких экзонов в проксимальном участке гена – 29% случаев, делеции одного экзона в центральном участке гена – 29% случаев, делеции нескольких экзонов в центральном участке гена – 38% случаев. У 63% пробандов с делециями отсутствовало два и более экзонов.

Таблица

Частоты встречаемости делеций экзонов гена DMD и их распределение в некоторых популяциях

Страна	Делеции экзонов, %	Делеции в проксимальном участке, %	Делеции в центральном участке, %	Ссылка:
Филлипины	31	64	36	Cutiongco et al., 1995
Китай*	34	30	60	Lo et al., 2006
Израиль	37	22	78	Shomrat et al, 1994
Испания	38,5	20	80	Patino et al, 1995
Беларусь*	40	29	67	Данное исследование
Россия	41	36,7	73,5	Baranov et al, 1993
Япония	43	21,3	76,6	Hiraishi et al, 1992
Китай	45	46	54	Soong et al, 1991
Турция	45,6	10,8	89,2	Gokgoz et al, 1993
Эстония	48	18	82	Talkop et al., 1999
Греция	54,4	26,5	73,5	Florentin et al, 1994
США*	56	29	69	Baumbach et al, 1989
Германия	59,7	7,5	92,5	Niemann-Seyde et al, 1992
Южная Индия	62	22	78	Mallikarjuna et al, 2003
Китай	62	31	69	Yuge et al., 1999
Северная Индия	72,7	15,9	81,8	Singh et al, 1997
Венгрия*	73	18	78	Herczegfalvi et al., 1999
Бразилия	87,5	47,5	52,5	Werneck et al., 2004

Примечание: в некоторых исследованиях, сумма частот делеций в проксимальном и центральном участках не равна 100%. Это связано с тем, что авторами были выявлены случаи делеций экзонов, не расположенных в этих двух участках, либо делеции, затрагивающие как проксимальный, так и центральный участок гена DMD.

Согласно анализу родословных, семейные случаи заболевания зафиксированы у 12 (22%) пациентов. Делеции экзонов выявлены у пяти-рех из них. При этом делеция в проксимальном участке гена обнаружена только у одного пациента. Полученные нами данные отличны от результатов работ ряда авторов, согласно которым 30% делеций локализовано в проксимальном участке гена и они ассоциированы с семейной формой заболевания, а делеции в центральном участке гена, которые встречаются в 70% случаев, характерны для изолированных случаев [2, 8]. Однако, это может быть связано с небольшим, на данный момент, ко-

личеством семей в исследуемой группе.

«Золотого стандарта» при постановке диагноза «мышечная дистрофия Дюшенна-Беккера» не существует. При медико-генетическом консультировании принимают во внимание возраст первых проявлений заболевания, клинические проявления, семейный анамнез. При биохимическом исследовании для пациентов характерно увеличение уровня креатинфосфаткиназы в сыворотке крови, при электромиографии – признаки первичного мышечного поражения.

В настоящее время при диагностике заболевания используется мПЦР, которая позволяет в результате одной реакции получать несколько

четко дифференцируемых по молекулярному весу участков гена. [4, 8]. Комбинирование нескольких мультиплексных реакций одновременно дает возможность проведения диагностики заболевания на генетическом уровне в короткие сроки.

По данным мировой литературы нет прямой корреляции между размером делеции и тяжестью заболевания. Различия в клинической картине могут быть объяснены исходя из молекулярно-генетической причины возникновения заболевания. Мышечная дистрофия типа Дюшенна развивается при наличии мутаций, повреждающих рамку считывания кодирующей области гена DMD. Результатом таких мутаций является нарушение синтеза или структуры функционально значимых доменов белка. У пациентов с мышечной дистрофией типа Бекера имеют место, как правило, мутации не приводящие к сдвигу рамки считывания, вследствие чего синтезируется измененный или укороченный дистрофин, сохраняющий частичную функциональную активность [2,6]. В качестве примера можно привести пациента с делецией 46% кодирующей последовательности дистрофина (делеция 17-48 экзонов), которая проявилась мягким фенотипом МДБ (16). В нашем исследовании, у пациента в делецией 8-44 экзонов, что составляет 50% кодирующей последовательности, заболевание проявилось с тяжелыми клиническими проявлениями МДД, неспособностью двигаться в двухлетнем возрасте и уровнем КФК, превышающим верхний предел нормы в 160 раз.

В случае, когда у пациента делеция экзона не выявлена, клинический диагноз не снима-

ется. Это связано с тем, что, как уже упоминалось ранее, помимо делеций, в 5-10% случаев у пациентов с МДДБ могут быть выявлены дупликации экзонов, а оставшаяся часть мутаций приходится на точковые мутации. Особенностью данных мутаций является их «индивидуальность» – у каждого пациента своя уникальная мутация. По мнению некоторых авторов, выявление делеций и дупликаций экзонов и точковых мутаций в экзонах гена DMD позволяет увеличить эффективность диагностики на молекулярно-генетическом уровне до 90% [17].

Предполагается, что примерно 30% мутаций гена DMD возникают *de novo* [2]. Поэтому особое место в диагностике МДДБ занимает установление гетерозиготного носительства женщиной мутантного гена DMD. Трудность заключается в том, что в нормальном кариотипе женщины присутствует две X хромосомы. Следовательно, при проведении мПЦР с ДНК носительницы, нормальный ген DMD послужит матрицей для образования продуктов амплификации всех исследуемых экзонов, в том числе и того или тех, делеции которых были выявлены у сына или кровного родственника мужского пола. Следовательно, этот анализ используется только для установления гемизиготного носительства делеций экзонов у лиц мужского пола в семьях с отягощенным анамнезом.

Этот метод можно использовать при проведении пренатальной ДНК-диагностики МДДБ в семье, где уже есть мальчик с установленной делецией экзона гена DMD, что позволит предотвратить повторное рождение ребенка с тяжелым заболеванием.

Заключение

1. Проведен анализ делеций экзонов гена DMD у белорусских пациентов с клиническим диагнозом «мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера».

2. Метод мПЦР позволяет подтвердить диагноз на молекулярно-генетическом уровне

у 40% пациентов.

3. Этот анализ дает возможность провести пренатальную ДНК-диагностику МДДБ в семье с высоким риском повторного рождения ребенка с этим заболеванием.

Список использованных источников

1. Emery AEH. Duchenne Muscular Dystrophy. Oxford Monographs on Medical Genetics (2nd ed.) / AEH Emery. Oxford, UK: Oxford Univ. Press – 1993. – Vol. XV. – P. 392.
2. Иллариошкин, С. Н., ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С. Н. Иллариошкин [и др.] М.: МИА, 2002. – Стр. 135-144.
3. Farah, M.G. Echocardiographic evaluation of left ventricular function in Duchenne's muscular dystrophy / M.G. Farah [et al.] // Am. J. Med. 1980. – Vol. 69. – P. 248-254.
4. Blake, D. J. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle / D. J. Blake [et al.] // Phys. Rev. 2002. – Vol. 82. – P. 291-329.
5. Koenig, M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals / M. Koenig [et al.] // Cell 1987 – Vol. 50(3). – P. 509-517.
6. Forrest, S.M. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies / S.M. Forrest [et al.] // Genomics 1988; 2(2):109–114.
7. den Dunnen, J.T. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications / J.T. den Dunnen [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1989. Vol. 45(6). – P. 835-847.
8. Горбунова, В. Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / В. Н. Горбунова [и др.] СПб.: Специальная литература. – 1997. – Стр. 287.
9. Sambrook, J. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. / J. Sambrook Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989.
10. Beggs, A. H. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction / A. H. Beggs [et al.] // Hum. Genet. – 1990. – 86. – P. 45-48.
11. Chamberlain, J.S. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy / J.S. Chamberlain [et al.] // Nucl. Acids Res. – 1988. – Vol. 16. – P.11141-11156.
12. Abbs, S. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene / S. Abbs [et al.] // Genomics. – 1990. – Vol.7. – P.602-606.
13. Мясников, С.О. Выявление делеций гена DMD при мышечной дистрофии Дюшенна у белорусских пациентов / С.О. Мясников [и др.] // Весці Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі, сер. мед. навук 2008. – №2 – с.5-7.
14. Cutiongco, E.M. More deletions in the 5' region than in the central region of the dystrophin gene were identified among Filipino Duchenne and Becker muscular dystrophy patients / E.M. Cutiongco [et al.] // Am.J.Med.Genet. 59: pp266-267. – 1995.
15. Werneck, L.C. Comparative analysis of PCR-deletion detection and immunohistochemistry in Brazilian Duchenne and Becker muscular dystrophy patients / L.C. Werneck [et al.] // Am J Med Genet. 2001, – Vol.103(2). – P. 115-120.
16. England, S.B. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin / S.B. England [et al.] // Nature 1990. – Vol.343. – P.180–182.
17. Prior, T. W. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophy / T. W. Prior [et al.] // JMD.2005. – Vol. 7. – P.317-326.

Н.Н. Чакова¹, Е.П. Михаленко¹, Э.В. Крупнова¹,
Н.В. Чеботарева¹, С.С. Кругленко¹, С.Ф. Золотухина², А.В. Ковкова³

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, GST, NAT2 И MDR1) У ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ

¹ГУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27,
²ГУ РНПЦ «Кардиология», Республика Беларусь, 220036, г. Минск, ул. р. Люксембург, 110,

³Республиканский центр спортивной медицины, Республика Беларусь, 220030, г. Минск, ул. Свердлова, 9

Введение

Одной из существенных проблем лекарственной терапии является вариабельность ответов пациентов на используемые лекарственные средства (ЛС). Гетерогенность реакций организма наблюдается также при приеме витаминов и других общеукрепляющих средств, применяемых с целью коррекции функционального состояния здорового человека, повышения общей физической работоспособности, для восстановления организма после перенесенных заболеваний. В результате применения одного и того же фармакологического препарата у отдельных людей наблюдается отсутствие терапевтического эффекта, у других возникают разнообразные осложнения – от незначительного недомогания до серьезных нарушений здоровья. К настоящему моменту известно множество причин, которые лежат в основе межиндивидуальных различий фармакологического ответа: пол, возраст, вес, характер течения заболевания, сопутствующая патология и т.д. Однако наиболее значимым стабильным фактором, детерминирующим кинетику метаболических превращений лекарственных препаратов в организме и гетерогенность реакций индивидуумов на ЛС, являются генетические особенности пациента [1]. Такие особенности реализуются через полиморфные участки генов белков, участвующих в фармакокинетике или фармакодинамике ЛС. Согласно оригинальной концепции фармакологической метрологии академика Л.А. Пирузяна индивидуальный ответ человека на применение ЛС определяется «стартовым состоянием» ферментативных систем метаболизма химических

соединений (ксенобиотиков) [2]. Генетический полиморфизм ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК) приводит к различиям в их активности от нескольких раз до десятков и сотен раз. В настоящее время идет планомерный поиск и идентификация функционально значимых полиморфизмов генов метаболизма ЛС для осуществления фармакогенетического тестирования (ФТ), поскольку оно рассматривается на данный момент как одна из важнейших технологий персонализированной медицины. Результаты ФТ позволят врачу провести выбор лекарственного средства и режима его дозирования индивидуально для каждого больного, обеспечивая тем самым максимальную эффективность и безопасность лекарственного лечения.

Однако необходимо принимать во внимание, что частота встречаемости аллельных вариантов генов метаболизма ЛС значительно варьирует в различных этнических группах, особенно принадлежащих к разным расам (от 0 до 50%) [3]. Поэтому необходимым является определение частот аллельных вариантов данных генов в конкретной популяции, так как очевидно, что внедрение ФТ по определенным генам будет целесообразным только в том случае, если аллельные варианты этих генов будут достаточно часто встречаться в популяции (более 1%). Целью нашего исследования был анализ генетического полиморфизма некоторых ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2C9* – I фаза; *GST*, *NAT2* – II фаза; *MDR1* – III фаза) у жителей Беларуси.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужила выборка из 328 человек (186 мужчин и 142 женщин), проживающих на территории Беларуси. По возрасту обследуемых выборка была разделена на 2 группы: «младше 45 лет» – 153 человека и «старше 45 лет» – 175 человек, статус курения был известен у 281 человек (72 курящих и 209 некурящих).

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили стандартным спосо-

бом с использованием фенол-хлороформной экстракции [4].

Генотипирование по генам *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *GSTP1*, *NAT2* и *MDR1* проводилось с использованием метода ПЦР-ПДРФ. Использованные праймеры и эндонуклеазы представлены в табл. 1.

Исследование полиморфизма *GSTM1* и *GSTT1* проводилось согласно методике, описанной ранее [5].

Таблица 1

Последовательность праймеров и характеристика аллелей анализируемых генов

Ген	Последовательность праймеров 5'□	Размер продукта	Нуклеотидная замена	Эндонуклеаза	Длины рестриктных фрагментов
<i>CYP1A2</i>	F - ggtatatggaaggtatcagc R - gggttgagatggagacattc	385 п.н.	C734A	<i>ApaI</i>	262+123 (аллель C) 385 (аллель A)
<i>CYP2C9</i>	F - cactggctgaaagactaacagag R - gtgatatggagtagggtcaccac	372 п.н.	C430T	<i>Sau96I</i>	179+119+74 (аллель C) 253+119 (аллель T)
<i>CYP2D6</i>	F -gccttegccaaccactcgg R- aaatcctgctcttccgaggc	354 п.н.	G1934A	<i>BstNI</i>	105+249 (аллель G) 354 (аллель A)
<i>GSTP1</i>	F - gtagtttgcccaaggtaag R - agccacctgaggggtaag	433 п.н.	A313G	<i>Alw26I</i>	329+104 (аллель A) 222+107+104 (аллель G)
<i>NAT2</i>	F - gctgggtctggaagctcctc R - ttgggtgatacatacacaaggg	547 п.н.	C481T G590A G857A	<i>Kpn I</i> <i>TagI</i> <i>BamHI</i>	433+114(аллель C) 547(аллель T) 222+170+155 (аллель G) 392+222+155 (аллель A) 490 (аллель G) 547 (аллель A)
<i>MDR1</i>	F -ttgatggcaagaataaagc R - ctacattaggcagtgactcg	207 п.н.	C3435T	<i>MboI</i>	145+62 (аллель C) 207 (аллель T)

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Statistica 6.0*. Для сравнения полученных распределений частот

генотипов и аллелей изучаемых полиморфизмов между исследуемыми группами использовали критерий χ^2 .

Результаты и обсуждение

В настоящее время активно изучается полиморфизм генов, кодирующих ферменты I фазы метаболизма ЛС, в частности изоферментов цитохрома P-450 (*CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP1A2*).

Фермент *CYP1A2* является ключевым компонентом монооксигеназ и катализирует окисление многих ксенобиотиков и лекарственных

средств. Идентифицировано более 40 генетических полиморфизмов фермента *CYP1A2*. Однако только для полиморфизма C734A в первом интроне гена *CYP1A2* показана ассоциация с активностью фермента: аллель A детерминирует более высокую активность фермента *CYP1A2*, а аллель C – низкую активность [6].

В табл. 2 приведены данные о распределении аллелей и генотипов *CYP1A2* в зависимости от пола, возраста и статуса курения у жителей Беларуси. В исследуемой популяции генотип *CC* встречается у

6,5%, *CA* – 47,2% и *AA* – 46,3%. Анализ зависимости частоты распределения генотипов и аллелей *CYP1A2* от пола, возраста и статуса курения не выявил достоверных различий.

Таблица 2

Распределение частот генотипов и аллелей *CYP1A2* у жителей Беларуси

Группа	Генотип						Аллель			
	<i>AA</i>		<i>CA</i>		<i>CC</i>		<i>A</i>		<i>C</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Всего, n=309	143	46,3	146	47,2	20	6,5	432	70,0	186	30
Мужчины, n=171	82	48,0	78	45,6	11	6,4	242	70,8	100	29,2
Женщины, n=138	61	44,2	68	49,3	9	6,5	190	68,8	86	31,2
Старше 45 лет, n=156	73	46,8	74	47,4	9	5,8	220	70,5	92	29,5
Младше 45 лет, n=153	70	45,8	72	47,1	11	7,1	212	69,3	94	30,7
Курящие, n=60	30	50,0	27	45,0	3	5,0	87	72,5	33	27,5
Некурящие, n=207	94	45,4	98	47,3	15	7,3	286	69,1	128	30,9

В таблице 3 представлено распределение частот генотипов и аллелей *CYP1A2* в разных популяциях. Частота встречаемости мутантного

аллеля *A* в Беларуси не отличалась от частоты встречаемости этого аллеля у европеоидов и достоверно выше, чем в японской популяции.

Таблица 3

Распределение частот (%) генотипов и аллелей *CYP1A2* в некоторых популяциях

Страна	Всего, n	Генотип			Аллель		χ^2	p
		<i>AA</i>	<i>CA</i>	<i>CC</i>	<i>A</i>	<i>C</i>		
Беларусь	309	46,3	47,2	6,5	70,0	30,0	-	-
Германия [7]	236	45,7	44,1	10,2	68,0	32,0	1,04	0,30
Япония [8]	159	39,0	44,6	16,4	61,0	39,0	20,57	<0,05
США [9]	333	49,0	41,0	10,0	69,5	30,5	0,03	0,86

Изоферменты *CYP2C9* и *CYP2D6* определяют биотрансформацию большого числа ЛС (нестероидные противовоспалительные препараты, непрямые антикоагулянты, антидепрессанты, ингибиторы ангиотензиновых рецепторов и др.). Активность ферментов ассоциирована с аллельным полиморфизмом и изменяется от полного отсутствия («медленный» метаболизатор) до ультра-быстрого метаболизма («быстрый» метаболизатор).

Было показано, что носители аллеля *CYP2C9*2* (*C430T*) характеризуются сни-

женной активностью фермента [10]. Вариант *CYP2C9*2* представляет собой замену в нуклеотидной последовательности в положении 430 цитозинового нуклеотида на тиминовый, что приводит к замене в аминокислотной последовательности *CYP2C9* в положении 144 аргинина на цистеин. Частоты встречаемости аллелей гена *CYP2C9* варьируют в различных этнических группах. Распространенность гомозигот по «медленному» аллелям гена *CYP2C9* среди европейского населения 3-5%. Общая частота аллеля

*CYP2C9*2* в различных популяциях колеблется в пределах 8–18% [11]. Результаты генотипирования белорусской популяции по полиморфизму *CYP2C9*2* (*C430T*) пред-

ставлены в таблице 4. У 71,0% обследованных обнаружен генотип *CC*; у 25,9% встречался гетерозиготный генотип *CT* и 3,1% были носителями гомозиготной мутации *TT*.

Таблица 4

Распределение частот генотипов и аллелей *CYP2C9* и *CYP2D6* у жителей Беларуси

Генотип						Аллель			
<i>CYP2C9</i>									
<i>CC</i>		<i>CT</i>		<i>TT</i>		<i>C</i>		<i>T</i>	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
115	71,0	42	25,9	5	3,1	272	84,0	52	16,0
<i>CYP2D6</i>									
<i>GG</i>		<i>GA</i>		<i>AA</i>		<i>G</i>		<i>A</i>	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
68	42,0	74	45,7	20	12,3	210	64,8	114	35,2

CYP2D6 участвует в метаболизме более чем 20% лекарственных средств. В настоящее время известно более 30 аллелей этого гена. Однако было показано, что 75% «медленных» метаболизеров по *CYP2D6* являются носителями мутации *CYP2D6*4* (*G1934A*) [12]. Частота встречаемости гомозиготной мутации *CYP2D6*4* значительно варьирует в различных этнических группах: у европейцев – 5-10%, афроамериканцев – 1,8%, китайцев – 1% [11,12,13].

У жителей Беларуси частота генотипа *AA*, определяющего полное отсутствие активности фермента *CYP2D6*, составила 12,3% (табл. 4). У 45,7% обследованных встречался генотип *GA* и 42,0% являлись носителями генотипа *GG*.

Ключевыми ферментами второй фазы биотрансформации являются глутатион-*S*-трансферазы (*GST*) и *N*-ацетилтрансферазы (*NAT*). Наиболее изученными из этих ферментов являются глутатионтрансферазы класса μ (*GSTM1*), класса θ (*GSTT1*) и класса π (*GSTP1*).

Полиморфизм *GSTM1* и *GSTT1* обусловлен наличием протяженной делеции в кодирующей области («нулевой генотип»). Важно отметить, что около 50% европейцев имеют гомозиготную делецию гена *GSTM1* и 10–20% – гомозиготную делецию гена *GSTT1* [14]. При данных мутациях

синтез соответствующего белкового продукта не происходит. Наличие «нулевого генотипа» хотя бы по одному из этих генов (*GSTM1* или *GSTT1*) связывают с увеличением риска развития мультифакториальных заболеваний. В последние годы появились данные об ассоциации полиморфизма *GSTM1* и *GSTT1* с развитием неблагоприятных реакции после химиотерапии [15]. Фермент глутатион *S*-трансфераза класса π (*GSTP1*) участвует в метаболизме широкого спектра ксенобиотиков, в т.ч. лекарственных препаратов. Полиморфизм *A313G* в 5 экзоне гена *GSTP1*, проявляющийся заменой изолейцина 105 на валин (*Ile105Val*), связывают с развитием лекарственной устойчивости при лечении онкозаболеваний. Watson et al. показал, что носители аллеля *G* (*Ile/Val* и *Val/Val*) характеризуются сниженной конъюгационной активностью фермента по сравнению с индивидуумами, имеющими генотип *AA* (*Ile/Ile*) [16].

Данные генотипирования *GST*-генов у жителей Беларуси представлены в таблице 5. Частота «нулевого» генотипа для генов *GSTT1* и *GSTM1* составила 14,1% и 41,6% соответственно, что согласуется с частотой встречаемости этих генотипов у европеоидов. Не выявлено достоверных различий в частоте встречаемости нуль-генотипов в зависимости от возраста, пола и статуса курения.

Таблица 5

Распределение частот генотипов и аллелей *GST* у жителей Беларуси

Генотип	Всего		Пол				Возраст				Статус курения			
			мужчины		женщины		<45		>45		курящие		некурящие	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>GSTM1(+)</i>	191	58,4	109	58,6	82	58,2	82	53,9	109	62,3	45	62,5	118	56,5
<i>GSTM1(-)</i>	136	41,6	77	41,4	59	41,8	70	46,1	66	37,7	27	37,5	91	43,5
<i>GSTT1(+)</i>	281	85,9	158	84,9	123	87,2	136	89,5	145	82,9	60	83,3	108	85,7
<i>GSTT1(-)</i>	46	14,1	28	15,1	18	12,8	16	10,5	30	17,1	12	16,7	29	14,2
<i>GSTP</i>														
<i>AA</i>	153	48,0	90	50,3	63	45,0	77	50,3	76	45,8	32	47,1	102	49,3
<i>GA</i>	140	43,9	72	40,2	68	48,6	66	43,2	74	44,8	33	48,5	90	43,5
<i>GG</i>	26	8,1	17	9,5	9	6,4	10	6,5	16	9,4	3	4,4	15	7,2
Аллель <i>A</i>	446	69,9	252	70,4	194	69,3	220	71,9	226	68,1	97	71,3	294	70,0
Аллель <i>G</i>	192	30,1	106	29,6	86	30,7	86	28,1	106	31,9	39	28,7	120	30,0

Анализ полиморфизма *A313G* гена *GSTP1* у населения Беларуси показал, что распределение частот генотипов было следующим: генотип *AA* – 48,0%; генотип *GA* – 43,9% и генотип *GG* – 8,1%. Для распределения генотипов *GSTP1* также не обнаружено досто-

верных различий в зависимости от возраста, пола и статуса курения. В изучаемой группе частота мутантного аллеля была сопоставима с частотами у представителей европеоидной расы; ниже, чем у афроамериканцев, и выше, чем в китайской популяции (табл.6).

Таблица 6

Распределение частот (%) генотипов и аллелей *GSTP1* в некоторых популяциях

Популяция	Всего, n	Генотип			Аллель		χ^2	p
		AA	GA	GG	A	G		
Жители Беларуси	309	48,0	43,9	8,1	70,0	30,0		
Европеоиды [16]	287	42,0	51,0	7,0	67,0	33,0	7,31	0.02
Афроамериканцы [17]	120	31,0	53,0	16,0	58,0	42,0	48,15	<0,05
Китайцы [18]	1211	67,0	30,0	3,0	82,0	18,0	63,41	<0,05

N-ацетилтрансфераза 2 является основным ферментом ацетилирования ксенобиотиков с первичной ароматической или гидразиновой структурой, включая некоторые лекарственные препараты. Известен метаболический полиморфизм ацетилирования, который проявляется наличием в популяции фенотипов «быстрых» и «медленных» ацетиляторов. В его основе лежат 13 точковых мутаций, в кодирующей области *NAT2*, которые в различных комбинациях образуют 36 аллелей [19]. Особенностью полиморфизма *NAT2* являются выраженные этнические

различия. Среди популяций Европы и Северной Америки от 40 до 70% являются «медленными» ацетиляторами, тогда как среди популяций тихоокеанского побережья Азии (японцы, китайцы, корейцы) «медленными» ацетиляторами являются только от 10 до 30% представителей [20,21]. Индивидуальные и этнические различия в степени ацетилирования оказывают влияние на развитие неблагоприятных реакций при приеме некоторых ЛС.

Нами было проведено генотипирование *NAT2* по трем полиморфным сайтам (*C481T*,

G590A, *G857A*). Полученные данные представлены в таблице 7. Частота встречаемости гомозиготной мутации (*TT*) в позиции *C481T* в обследованной группе составила 13,0%,

гомозиготная замена (*AA*) в позиции *G590A* встречалась у 8,0%. Следует отметить, что при изучении полиморфизма *G857A* не обнаружено индивидуумов, имеющих генотип *AA*.

Таблица 7

Частота встречаемости некоторых полиморфизмов *NAT2* у жителей Беларуси

Генотип	Всего (n=321)		Пол				Возраст				Статус курения			
			мужчины (n=182)		женщины (n=139)		<45 (n=153)		>45 (n=168)		курящие (n=69)		не курящие (206)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>C481T</i>														
<i>CC</i>	83	23,2	47	25,8	38	27,3	44	28,8	41	24,4	16	23,2	51	24,8
<i>CT</i>	180	63,8	99	54,4	81	58,3	77	50,3	103	61,3	44	63,8	114	56,3
<i>TT</i>	56	13,0	36	19,8	20	14,4	32	20,9	24	14,3	9	13,0	41	19,9
Аллель <i>C</i>	350	54,5	193	53,0	157	56,5	165	53,9	185	55,1	76	55,1	216	52,4
Аллель <i>T</i>	292	45,5	171	47,0	121	43,5	141	46,1	151	44,9	62	44,9	196	47,6
<i>G590A</i>														
<i>GG</i>	143	44,5	86	47,3	57	41,0	73	47,7	70	41,7	25	36,2	102	49,5
<i>GA</i>	152	47,5	85	46,7	67	48,2	66	43,3	86	51,2	40	58,0	85	41,7
<i>AA</i>	26	8,0	11	6,0	15	10,8	14	9,2	12	7,3	4	5,8	19	9,2
Аллель <i>G</i>	438	68,2	257	70,6	181	65,1	212	69,3	226	67,3	90	65,2	289	70,1
Аллель <i>A</i>	204	31,8	107	29,4	97	34,9	94	30,7	110	32,7	48	34,8	123	29,9
<i>G857A</i>														
<i>GG</i>	258	80,5	152	83,5	106	76,3	127	83,0	131	78,0	51	73,9	164	79,6
<i>GA</i>	63	19,5	30	16,5	33	23,7	26	17,0	37	22,0	18	26,1	42	20,4
<i>AA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Аллель <i>G</i>	579	81,2	334	91,8	245	88,1	280	91,5	299	89,0	120	87,0	370	89,8
Аллель <i>A</i>	63	9,8	30	8,2	33	11,9	26	8,5	37	11,0	18	13,0	42	10,2

В соответствии с принятыми подходами обследованных индивидуумов делили на «быстрых» и «медленных» ацетиляторов [20]. К «быстрым» ацетиляторам относили обладателей трех доминантных аллелей в гомозиготном состоянии *481CC*, *590GG* и *857GG*, а также тех, у кого только один из трех исследуемых генотипов находится в гетерозиготном состоянии (*481CT*, *590GG*, *857GG*; *481CC*, *590GA*,

857GG и *481CC*, *590GG*, *857GA*). Все остальные комбинации генотипов составили группу «медленных» ацетиляторов. Частота «быстрых» ацетиляторов среди жителей Беларуси составила 35,6%, а «медленных» ацетиляторов – 64,4% (табл. 8). Наблюдаемое соотношение «быстрых» и «медленных» ацетиляторов достоверно отличалось от распределения ацетиляторов в популяциях Германии и Италии.

Таблица 8

Частота (%) встречаемости «быстрых» и «медленных» ацетиляторов в разных популяциях

Страна	«Быстрые» ацетиляторы	«Медленные» ацетиляторы	χ^2	p
Беларусь	35,6	64,4		
Германия [22]	43,2	56,8	7,82	<0,05
Италия [23]	48,2	51,8	9,65	<0,05
Швеция [24]	40,5	59,5	3,28	0,07
США [25]	37,9	62,1	0,64	0,42

В последние годы начато изучение влияния на фармакинетику ЛС *P*-гликопротеина, кодирующегося геном *MDR1*. *P*-гликопротеин участвует в элиминации широкого круга ЛС во внеклеточное пространство. Уровень экспрессии фермента обуславливает концентрацию лекарства в клетке: чем выше экспрессия активного транспортера, тем быстрее выводятся субстрат или его метаболиты из клетки и тем скорее

снижается их концентрация. Было установлено, что только полиморфизм *C3435T* ассоциирован с уровнем экспрессии *P*-гликопротеина: *C/C*-гомозиготы характеризуются высоким уровнем экспрессии *P*-гликопротеина, *T/T*-гомозиготы – низким, а гетерозиготы *C/T* – промежуточным [26]. Частота встречаемости замены *C3435T* значительно различается между этническими группами (табл. 9).

Таблица 9

Частота (%) генотипов *MDR1* в разных популяциях

Популяция	Генотип		
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
Англичане [27]	24,0	48,0	28,0
Немцы [26]	28,0	48,0	24,0
Россияне [11]	21,0	49,0	30,0
Поляки [28]	42,0	41,0	17,0
Афроамериканцы [27]	68,0	31,0	1,0
Китайцы [27]	32,0	42,0	26,0
Японцы [26]	35,0	53,0	12,0

Распределение генотипов *MDR1* у жителей Беларуси (табл. 10) соответствовало частоте встречаемости генотипов в европейских по-

пуляциях и, было следующим: *CC* – 20,7%, *CT* – 53,4%, *TT* – 25,9%.

Таблица 10

Распределение частот генотипов и аллелей *MDR1* у жителей Беларуси

Группы	Генотип						Аллель			
	<i>CC</i>		<i>CT</i>		<i>TT</i>		<i>C</i>		<i>T</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Всего, <i>n</i> =324	67	20,7	173	53,4	84	25,9	307	47,4	341	52,6
Мужчины, <i>n</i> =183	38	20,8	103	56,3	42	22,9	179	48,9	187	51,1
Женщины, <i>n</i> =141	29	20,6	70	49,6	42	29,8	128	45,4	154	54,6
Старше 45 лет, <i>n</i> =171	33	19,3	95	55,6	43	25,1	161	47,1	181	52,9
Младше 45 лет, <i>n</i> =153	34	22,2	78	51,0	41	26,8	146	47,7	160	52,3
Курящие, <i>n</i> =70	10	14,3	43	61,4	17	24,3	63	45,0	77	55,0
Некурящие, <i>n</i> =209	48	23,0	104	49,8	57	27,2	200	47,8	218	52,2

Для распределения генотипов *MDR1* не обнаружено достоверных различий по возрасту, полу и статусу курения. Из данных литературы известно, что экспрессия *P*-гликопротеина у мужчин в 2,4 раза выше, чем у женщин [30]. Поэтому фармакогенетические исследования

по метаболизму ЛС, являющихся субстратом *P*-гликопротеина, необходимо проводить, учитывая половые различия. Применение подобного подхода позволит дифференцированно подойти к назначению терапевтической дозы ЛС у мужчин и женщин.

Заключение

Впервые проведены исследования генетического полиморфизма ферментов биотрансформации, участвующих в метаболизме ЛС, у белорусского населения. Эти исследования могут лечь в основу индивидуального генетического паспорта, который позволит скорректировать лечение (выбор ЛС и режима

его дозирования) с учетом индивидуальных особенностей пациентов, что сделает фармакотерапию более эффективной и безопасной. При этом следует подчеркнуть, что генетическая составляющая эффективности и/или токсичности ЛС может быть определена до начала лечения.

Список использованных источников

1. Daly, A.K. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes / A.K. Daly // *Fundamental and Clinical Pharmacology*. – 2003. – Vol. 17. – P. 27-41.
2. Пирузян, Л.А. Метаболический паспорт человека – основа новой стратегии в фармакологии / Л.А.Пирузян // *Вести. РАН*. – 2004. – Т. 74. – С. 610–618.
3. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response / H.G.Xie [et al.] // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2001. – V. 41. – P. 815-850.
4. Mathew, C.C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C.C. Mathew// in Walker JMNJ (ed): *Methods in Molecular Biology*, Clifton: Human Press, 1984. – Vol. 2. – P. 31-34.
5. Полиморфизм GST-генов и цитогенетические изменения в ткани легкого больных раком легкого / Н.Н. Чакова [и др.] // *Цитология и генетика*. – 2009. – Т. 43, № 1. – С. 48-53.
6. Colorectal Cancer Study Group. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism / C. Sachse [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 55. – P. 68-76.
7. Functional significance of a C->A polymorphism in intron 1 of the CYP1A2 gene tested with caffeine/ C.Sachse [et al.] // *J. Clin. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 47. – P. 445-449.
8. Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-Flanking Region and intron 1 in human CYP1A2 in the Japanese population / M.Chida [et al.] // *J. Cancer res.* – 1999. – Vol. 90. – P. 899-902.
9. Polymorphisms of cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase genes, smoking, and risk of pancreatic cancer / D.Li [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2006. – Vol. 27, № 1. – P. 103-111.
10. Кукес, В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клиникофармакологические аспекты – М.: Реафарм, 2004. – 144 с.
11. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population / E.A. Gaikovitch [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 59, № 4. – P. 303-312.
12. Сычев, Д.А. Клиническая фармакогенетика. Клиническая фармакология / Под ред. академика РАМН, проф В.Г. Кукеса – М.: ГЕОТАР-МЕД, 2004.
13. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype / R.Saxena [et al.] // *Hum. Molec. Genet.* – 1994. – Vol. 3. – P. 923-926.
14. Гуляева, Л.Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе / Л.Ф. Гуляева, В.А. Вавилин, В.В. Ляхович // Новосибирск: Серия «Экология», 2000. – Вып. 57. – 85 с.
15. Моисеев, А.А. Изучение фармакогенетических факторов, влияющих на эффективность и токсичность цисплатина при раке яичников: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.14 / А.А. Моисеев; Рос. онкол. науч. центр им. Н.Н. Блохина РАМН. – М, 2008. – 26 с.
16. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution / M.A. Watson [et al.] // *Carcinogenesis*. – 1998. – Vol. 19. – P. 275-280.
17. Combinations of glutathione S-transferase genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: a population-based study / M.L.Cote [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2005. – Vol. 26, № 4 – P. 811-819.

18. Genetic Polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the Risk for Breast Cancer: Results from the Shanghai Breast Cancer Study and Meta-Analysis / K. M. Egan [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2004. – Vol. 13. – P. 197-204.
19. Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. / J.M. Walraven [et al.] // *Curr Drug Metab.* – 2008 – Vol. 9, № 6. – P. 471-486.
20. Hein, D.W. Update on consensus arylamine N-acetyltransferases nomenclature / D.W. Hein, D. M. Grant, E. Sim // *Pharmacogenetics*. – 2000. – Vol. 10. – P. 291-292.
21. Deciphering the ancient and complex evolutionary history of human arylamine N-acetyltransferase genes / E. Patin [et al.] // *Am J Hum Genet.* – 2006. – Vol. 78, № 3. – P. 423-436.
22. Risch Relevance of N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1, NAT2) genetic polymorphisms in non-small cell lung cancer susceptibility / H. Wikman [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 2001. – Vol. 11. – P. 157-168.
23. Polymorphisms in metabolic genes, their combination and interaction with tobacco smoke and alcohol consumption and risk of gastric cancer: a case-control study in an Italian population / S. Boccia [et al.] // *BMC Cancer* 2007. – Vol. 7:206.
24. Differential Interactions between GSTM1 and NAT2 Genotypes on Aromatic DNA Adduct Level and HPRT Mutant Frequency in Lung Cancer Patients and Population Controls / S.M. Hou [et al.] // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2001. – Vol. 10. – P. 133-140.
25. McGrath, M. Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women / M. McGrath, D. Michaud, I.D. Vivo // *MC Cancer*. – 2006. – 6:239.
26. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo / Hoffmeyer S. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – Vol. 97, № 7. – P. 3473-3478.
27. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity / M.M. Ameyaw [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 2001. – Vol. 11, № 3. – P. 217-221.
28. Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of Polish population/ K. Jamrozik [et al.] // *Pol. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 54, № 5. – P. 495-500.
29. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects / T. Sakaeda [et al.] // *Pharm. Res.* – 2001. – Vol. 18, № 10. – P. 1400-1404.
30. Schuetz, E.G. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms/ E.G. Schuetz, K.N. Furuya, J.D. Schuetz // *Pharmacol Exp Ther.* – 1995. – Vol. 275, № 2. – P. 1011-1018.

Дата поступления статьи 30 сентября 2009 г.

О.М. Хурс, А.Д. Политыко, Н.В. Румянцева, Л.В. Исакович, В.Д. Кулак, Т.М. Егорова, И.В. Наумчик

СИНДРОМ ВИЛЛЬЯМСА В БЕЛАРУСИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»,
Республика Беларусь, 220053, г. Минск, ул. Орловская, 66

Введение

Синдром Вилльямса (СВ; WS, OMIM 194050) – мультисистемное генетическое заболевание, повреждающее соединительную ткань и центральную нервную систему. Синдром был описан независимо друг от друга в 1961 и 1962 годах двумя врачами кардиологами J.C. Williams и A.J. Beuren [1, 2]. Популяционная частота варьирует и составляет 1 на 7500-25000 новорожденных [3]. Соотношение мужского и женского полов примерно 1:1. Классический симптомокомплекс включает: специфические черепно-лицевые дизморфии («лицо эльфа», «звездчатые» радужки); пороки сердечно-сосудистой системы (ПССС), среди которых наиболее частыми являются надклапанный стеноз аорты (НСА) и стеноз легочной артерии (СЛА); неонатальную гиперкальциемию; аномалии соединительной ткани (гиперподвижность суставов, грыжи); задержку физического развития (ЗФР), в том числе пренатальную гипоплазию; задержку психоречевого развития (ЗПРР), поведенческие особенности (повышенная общительность и дружелюбность, словоохотливость) [4, 5].

Причиной заболевания является микроделеция 7q11.23 размером порядка 1,55 – 1,84Mb [6]. Синдромы микроделений – это «синдромы делеций сопредельных генов». Данный термин подразумевает утрату множественных физически сопредельных, но функционально несвязанных генов, что приводит к формированию широкого спектра фенотипических признаков при заболевании.

Известно, что у человека нормальное развитие организма обусловлено полноценным вкладом материнского и отцовского геномов

при слиянии гамет и формировании зиготы. Ввиду этого большинство аутомсомных генов считаются с обоими аллелями – материнского и отцовского. Делеция в одной из хромосом приводит к уменьшению дозы продуктов генов, что и реализуется в формирование аномального фенотипа. Группа таких дозависимых генов (в частности ген *ELN*) расположена в длинном плече хромосомы 7 в сегменте q11.23. Данный регион имеет специфическое строение и фланкирован высокомолекулярными последовательностями ДНК. Это является причиной неравного кроссинговера (2/3 случаев) или внутривхромосомной рекомбинации (1/3 случаев) в процессе мейоза [6]. Утрата критических генов как следствие этих процессов при оогенезе или сперматогенезе и приводит к возникновению микроделеции и СВ.

У большинства пациентов микроделеция 7q11.23 является спорадической. Однако описаны семьи, где были обнаружены делеции размером менее 1,55Mb с вертикальной передачей по аутомсомно-доминантному типу [7, 8, 9, 10]. Отмечается, что в таких случаях носители субмикроскопических перестроек демонстрировали неполноту симптомокомплекса СВ. Кроме того, описан случай семейной сбалансированной структурной перестройки с вовлечением критической области 7q11.23, сопровождавшейся как формированием классического СВ, так и наличием нормального фенотипа в пределах одной семьи [11].

Ввиду малого размера микроделеция не может быть идентифицирована с помощью стандартного GTG-анализа хромосом. В диагностике таких хромосомных нарушений широко используется

молекулярно-цитогенетический метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Целью данного исследования явилось изучение частоты микроделеции 7q11.23 в группе

пациентов с клинически предполагаемым СВ, оценка размеров возникших делеций и описание варибельности фенотипических признаков СВ в Беларуси.

Материалы и методы

Исследуемую группу составили пациенты, направленные педиатрами, неврологами, кардиологами на медико-генетическое консультирование в ГУ РНПЦ «Мать и дитя» и в областные медико-генетические центры, а также дети, отобранные для консультации по медицинской документации и регистру врожденной патологии медико-генетической службы Беларуси. Была сформирована выборка из 39 пробандов с предполагаемым клиническим диагнозом СВ: 20 мальчиков и 19 девочек в возрасте от 14 дней до 23 лет.

Цитогенетическая диагностика. Препараты метафазных хромосом были получены из ФГА-стимулированной культуры лимфоцитов периферической крови согласно стандартным процедурам. Исследование выполнено с применением цитогенетического анализа GTG-

окрашенных хромосом (550-800 сегментов в гаплоидном наборе).

Молекулярно-цитогенетическая диагностика. FISH проводилась по стандартному протоколу на препаратах метафаз хромосом лимфоцитов периферической крови. Диагностика выполнена с применением флуоресцентных локус-специфических ДНК-проб, предназначенных для выявления критических генов в сегменте: Williams Region Probe (LSI ELN, LIMKI, D7S613 Spectrum Orange/ 7q31 LSI D7S486, D7S522 Spectrum Green) (Vysis), а также LSI Williams-Beuren Region Probe (FZD9, WBSCR10, TBL2; LIMKI, WBSCR2, D7S613, WBSCR1, RFC2; CYLN2 Direct Red/ 7q22 LSI control Green) (Q-biogene). Анализ хромосом осуществлялся с помощью флуоресцентного микроскопа DMLB (Leica).

Результаты и обсуждение

Цитогенетическое обследование пробандов. Для исключения конституциональных перестроек выполнен стандартный анализ кариотипа всех пациентов с помощью GTG-метода дифференциального окрашивания метафазных хромосом. У всех обследованных индивидов установлен нормальный кариотип.

Молекулярно-цитогенетическая диагностика. С целью выявления генетического дефекта – микроделеции 7q11.23, проведен анализ FISH с использованием локус-специфических ДНК-проб, имеющих в своем составе критические гены СВ (рис. 1). Гемизиготное состояние критической области в результате микроделеции установлено у 24 из 39 обследованных пациентов.

К настоящему времени выяснено, что основ-

ным отвечающим за фенотипические проявления при СВ является ген эластина *ELN*. Наиболее часто обнаруживается делеция размером 1,55Mb. Однако в литературе описаны микроделеции в критической области 7q11.23, имеющие нестандартный размер менее 1,55Mb (рис. 1). Следует подчеркнуть при этом, что ген *ELN* был утрачен во всех представленных случаях, и лишь в одном исследовании была делетирована его часть [10, 12, 13, 14, 15]. Поэтому лабораторная диагностика СВ с помощью FISH с целью выявления микроделеции 7q11.23 предполагает использование молекулярных ДНК-проб, в состав которых обязательно включен ген *ELN*. Использование ДНК-проб с другим составом маркеров может дать ложно отрицательный результат.

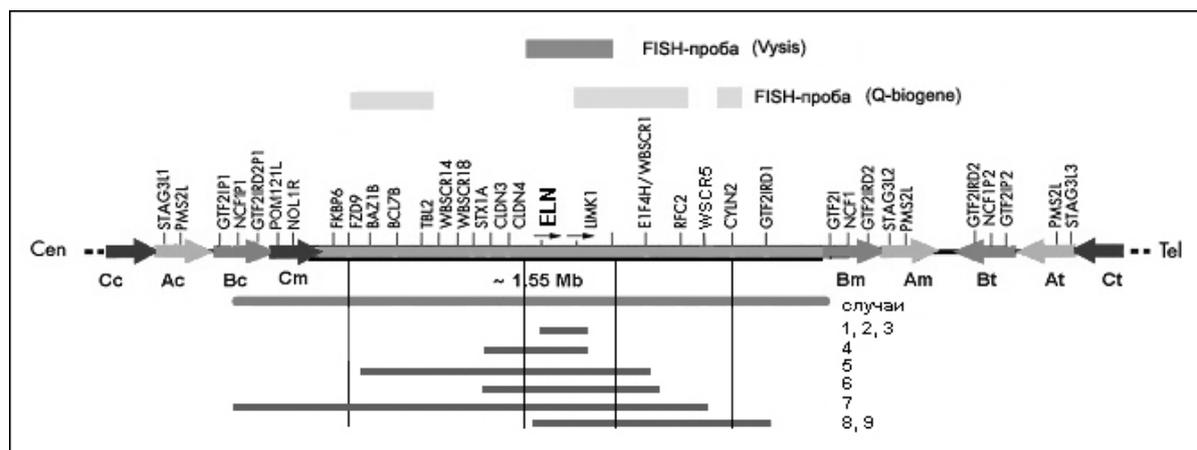


Рис. 1. Схема критической области СВ в сегменте 7q11.23. Толстые горизонтальные линии вверху - локализация клонированных ДНК-проб, используемых для выявления микроделеции методом FISH. Тонкие горизонтальные линии внизу: границы наиболее типичной делеции (1,55Mb) и атипичных микроделеций, описанных в литературе. Случаи 1, 2, 6 - [13]; случаи 3, 4, 8 - [10]; случай 5 - [14]; случай 7 - [12]; случай 9 - [15].

Для уточнения рамки делеции и оценки размера микропотери проведена FISH с молекулярной ДНК-пробой, включающей 9 маркеров (FZD9, WBSCR10, TBL2; LIMK1, WBSCR2, D7S613, WBSCR1, RFC2, CYLN2) (рис. 1), которые покрывают большую часть критической области СВ. Отсутствие флуоресцентного сигнала на одной из гомологичных хромосом 7 при проведении данного теста служит дополнительным молекулярным подтверждением диагноза. Кроме того, это свидетельствует о потере большинства критических генов СВ во всех 24 исследованных случаях.

Таким образом, нами показано, что у больных в белорусской популяции рамка делеции при СВ включает ген *ELN* и как минимум захватывает область между клонами *FZD9* и *CYLN2*. Это позволяет предположить, что размер утраченного хромосомного материала у наших пациентов составляет порядка 1,55 Mb. Делеций атипично малого размера нами не обнаружено.

В одном случае у отца ребенка с установленной микроделецией 7q11.23 наблюдались некоторые характерные для СВ фенотипические проявления (ПССС и «звездчатые» радужки). Проведенная диагностика FISH хромосомной аберрации не выявила. Таким образом, все делеции, обнаруженные в кариотипах 24 пробандов, возникли *de novo*.

Анализ вариативности фенотипических признаков.

По количеству больных мужского и женского пола (13 и 11 соответственно) достоверных различий не найдено ($\chi^2=0,17$, $p>0,05$), что согласуется с данными литературы [3]. Черепнолицевые дизморфии (высокий лоб, короткий нос с открытыми вперед ноздрями и округлым кончиком, длинный фильтр, микрогения, макростомия), описываемые как «лицо эльфа», отмечены в 100% случаев. Специфические для синдрома «звездчатые» радужки наблюдались в 54%.

Один из ведущих диагностических признаков – ПССС, обнаружен у всех пациентов с СВ, однако в 2 случаях вид порока не был уточнен и патология описана как систолический шум в сердце. Ввиду данного обстоятельства анализ особенностей ПССС выполнен для 22 пациентов исследованной группы (табл. 1). НСА – наиболее частый ПССС при СВ, выявлен у 42% мальчиков и у 20% девочек, с такой же частотой диагностирован СЛА. По опубликованным данным, степень тяжести ВПС связана с полом и значимо выше у мальчиков [16, 17]. В подтверждение этого, в нашей группе достоверно реже у мальчиков, чем у девочек встречался изолированный ПССС – 8% и 60% соответственно ($t=2,59$, $p<0,05$). Кроме того, типичные для СВ НСА и/или СЛА в 1,7 раза чаще выявлены у мальчиков (8/12), чем у девочек (4/10), однако эта разница не достоверна ($t=1,25$, $p>0,05$).

Таблица 1

Спектр и частота ПССС у пациентов с СВ

ПССС	Пол				Общее количество	
	М		Ж			
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Кол-во пробандов	12		10		22	
НСА	5	42	2	20	7	32
СЛА	5	42	2	20	7	32
КА	4	33	3	30	7	32
ДМПП	3	25	0	0	3	14
ДМЖП	2	17	3	30	5	23
НАК	1	8	1	10	3	14
НТК	1	8	1	10	2	9
ПМК	2	17	2	20	4	18
ООО	5	42	1	10	6	27
ДХЛЖ	3	25	0	0	3	14
Другие	1	8	1	10	2	9

Примечание: КА – коарктация аорты, ДМПП – дефект межпредсерной перегородки, ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки, НАК – недостаточность аортального клапана, НТК – недостаточность трикуспидального клапана, ПМК – пролапс митрального клапана, ООО – открытое овальное окно, ДХЛЖ – дополнительная хорда левого желудочка. ПССС больше, чем общее количество детей ввиду частого обнаружения комбинированных пороков сердца.

Результаты анализа частоты встречаемости основных дефектов сердца у детей с СВ в белорусской популяции и при исследованиях в других выборках представлены в таблице 2. В нашей группе пациентов в 2 раза реже диагностировался НСА, число

СЛА сопоставимо с данными литературы. В то же время, процент обнаружения КА составил 32%, что отличается от данных, представленных в литературе, где частота выявления КА существенно ниже: 3% [19], 7% [24], 11% [5].

Таблица 2

Частота обнаружения основных ПССС у пациентов с СВ

	Общее кол-во пациентов	Кол-во пациентов с ВПС	НСА (%)	СЛА (%)
Собственное исследование	22	22 (100%)	32	32
Biamino E. et al. [18]	22	22 (100%)	55	41
Hirota H. et al. [19]	32	32 (100%)	94	53
Eronen M. et al. [5]	75	44 (59%)	73	41
Perez Jurado L. et al. [20]	48	48 (100%)	50	27
Wang M.S. et al. [4]	65	48 (74%)	42	48
Del Campo M. et al. [21]	96	63 (66%)	67	48
Общие данные литературы	338	257 (76%)	64	43

Пренатальная гипоплазия описана в 78% случаев, ЗФР на момент обследования отмечена в 96%. 21 пациент в возрасте от 1 года 1 месяца до 23 лет имел ЗППР, для остальных детей с СВ степень психо-речевого развития не оценивалась ввиду их малого возраста. В

5 случаях, для которых было проведено исследование по определению в крови уровня кальция, гиперкальциемия не найдена. Согласно опубликованным сведениям, встречаемость данного признака в различных выборках больных СВ широко варьирует от

5% до 45% [5, 22]. Примерно половина обследованных пациентов имела другие врожденные пороки развития: паховые грыжи отмечены у 38% детей, различные аномалии скелета – в 50%.

Для проведения как можно более ранней диагностики заболевания и обоснованного отбора пациентов в группу риска по выявлению СВ

важно учитывать возраст манифестации клинических проявлений. Нами выполнен анализ частоты обнаружения микроделеции 7q11.23 в различных возрастных подгруппах. Частота установления генетического дефекта среди детей первого года жизни составила 60%, в возрасте от 1 года до 6 лет – 55%, от 6 лет до 10 лет – 67%, после 10 лет – 78% (рис. 2).

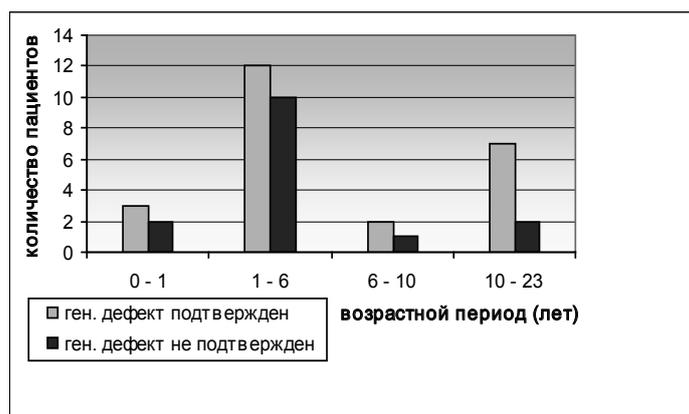


Рис. 2. Частота установления генетического дефекта у пациентов с клинически предполагаемым диагнозом СВ в различных возрастных группах.

Таким образом, процент подтверждения клинически предполагаемого диагноза СВ во всех возрастных периодах достаточно высок. Это объясняется наличием очень характерной клинической картины уже в младенческом периоде, которая становится еще более четкой с увеличением возраста ребенка.

Общая частота выявления микроделеции во всей обследованной группе пациентов составила 62%.

Данный показатель не отличается от такового в исследованиях, проведенных в Испании – 43% (41/95) [23], Англии – 48% (25/52) [22], Турции 87,5% (14/16) [24] ($t=1,74$, $t=1,06$ и $t=1,57$ соответственно, $p>0,05$). В США, где применялись более жесткие критерии подбора группы риска по выявлению СВ, эффективность обнаружения микроделеции 7q11.23 составила 94% (61/65), что значительно выше ($t=3,87$, $p<0,05$) нашего показателя [20].

Заключение

Впервые в Беларуси выполнена молекулярно-цитогенетическая диагностика СВ. Проведенное исследование показало высокую частоту выявления микроделеции 7q11.23, которая составила 62%.

Все пациенты имели утрату хромосомного материала размером порядка 1,55Mb, включающую ген *ELN* и как минимум участок критической области между генами *FZD9* и *CYLN2*. Делеции атипичного малого размера не обнаружены. Во всех случаях хромосомная aberrация возникла *de novo*.

Описана вариабельность фенотипических

признаков у пациентов с СВ в белорусской популяции. У пробандов мужского пола выявлена более тяжелая степень ПССС.

Использование молекулярно-цитогенетического метода FISH позволило улучшить клиническую диагностику СВ и усовершенствовать медико-генетическое консультирование. Обнаружение микроделеции - спорадической мутации, дает возможность прогнозировать низкий генетический риск повторения заболевания в семье. Установление диагноза в малом возрасте позволяет начать раннее обоснованное симптоматическое

лечение, направленное на коррекцию соматической патологии, улучшение показателей психического развития, стимуляцию роста, что приведет к повышению качества жизни и социальной адаптации пациентов.

Исследования выполнены при поддержке Института генетики человека и антро-

пологии, г. Йена, ФРГ, доктора Томаса Лиры. Выражаем благодарность за сотрудничество коллегам, работающим в клинично-диагностической генетической лаборатории ГУ «РНПЦ «Мать и дитя» и в областных медико-генетических центрах Беларуси.

Список использованных источников

1. Williams, J.C. Supravalvular aortic stenosis / J.C. Williams, B.G. Barratt-Boyes, J.B. Lowe // *Circulation*. – 1961. – Vol. 24. – P. 1311-1318.
2. Beuren, A.J. Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance / A.J. Beuren, J. Apitz, D. Harmjanz // *Circulation*. – 1962. – Vol. 26. P. 1235-1240.
3. Mutation mechanisms of Williams-Beuren syndrom deletions / M. Bayes [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 73. – P. 131-151.
4. Molecular and clinical correlation study of Williams-Beuren syndrome: no evidence of molecular factors in the deletion region or imprinting affecting clinical outcome / M.S. Wang [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1999. – Vol. 86. – P. 34-43.
5. Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome / M. Eronen [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2002. – Vol. 39. – P. 554-558.
6. Tassabehji, M. Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations / M. Tassabehji // *Hum. Mol. Genet.* – 2003. – Vol. 12. – P. 229-237.
7. Familial Williams-Beuren syndrome / K. Ounap [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1998. – Vol. 80. – P. 491-493.
8. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin / Y.Q. Wu [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1998. – Vol. 78. – P. 82-89.
9. Familial Williams-Beuren syndrome showing variable clinical expression / R. Pankau [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2001. – Vol. 98. – P. 324-329.
10. GTF2I hemizyosity implicated in mental retardation in Williams syndrome: genotype-phenotype analysis in five families with deletions in Williams syndrome region / C. Morris [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 2003. – Vol. 123. – P. 45-59.
11. The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams-Beuren syndrome / H.C. Duba [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2002. – Vol. 10. – P. 351-361.
12. Using case study comparisons to explore genotype-phenotype correlations in Williams-Beuren syndrome / A. Karmiloff-Smith [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2003. – Vol. 40. – P. 136-140.
13. Williams syndrome: use of chromosomal microdeletions as a tool to dissect cognitive and physical phenotypes / M. Tassabehji [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. – Vol. 64. – P. 118-125.
14. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome / J.R. Korenberg [et al.] // *J. Clin. Neurosci.* – 2000. – Vol. 12 – P. 89-107.
15. Del Campo M. Partial features of Williams-Beuren syndrome in a family with a novel 700 kb 7q11.23 deletion / M. Del Campo [et al.] // *Abs. of 10th international congress of Human Genetics, Vienna, 2001.* / *Europ. J. Hum. Genet.* – 2001. – P. 55.
16. Differences by sex in cardiovascular disease in Williams syndrome / L.S. Sadler [et al.] // *J. Pediatr.* – 2001. – Vol. 139. – P. 849-853.
17. Hemizyosity in NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension / M. Del Campo [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 78. – P. 533-541.
18. Biamino, E. Presenting phenotype and clinical evaluation in a cohort of 22 Williams-Beuren syndrome patients/ E. Biamino [et al.] // *Abs. of European Human Genetics conference, Nice, France, 2007.* / *Europ. J. Hum. Genet.* – 2007. – Vol. 15, Supl. 1. – P. 95.
19. Molecular cytogenetic diagnosis of Williams syndrome / H. Hirota [et al.] // *Am. J.*

Hum. Genet. – 1996. – Vol. 64. – P. 473-477.

20. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth / L.A. Perez Jurado [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1996. – Vol. 59. – P. 781-792.

21. Hemizyosity in *NCF1* gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension / M. Del Campo [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2006. – Vol. 78. – P. 533-541.

22. Williams-Beuren syndrome: phenotypic

variability and deletion of chromosomes 7, 11, and 22 in a series of 52 patients / C.A. Joyce [et al.] // J. Med. Genet. – 1996 – Vol. 33, № 12. – P. 491-493.

23. FISH and molecular studies in 95 patients with clinical suspicion of Williams-Beuren syndrome (WBS) / A. Carrio [et al.] // Cytogenet. Cell Genet. – 1999. – Vol. 85, № 5. – P. 144.

24. FISH analysis in patients with clinical diagnosis of Williams syndrome / N. Elcioglu [et al.] // Acta. Pediatr. – 1998. – Vol. 87. – P. 48-53.

*Дата поступления статьи
30 августа 2009 г.*

РЕФЕРАТЫ

SUMMARIES

УДК 631.527.33

Иванцова, Е.Ю. Корреляционный анализ признаков урожайности, лежкости и биохимического состава плодов томата (*Lycopersicon esculentum* mill) / Е.Ю. Иванцова, А.В. Кильчевский. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 7-12.

Настоящими исследованиями выявлены сильная и средняя отрицательная корреляционная связь между лежкостью плодов и ранней урожайностью, лежкостью плодов и содержанием сахаров в плодах молочной степени зрелости, средняя положительная корреляционная связь между лежкостью плодов и общей кислотностью в плодах молочной степени зрелости.

Ключевые слова: корреляционная связь, лежкость плодов, степень зрелости.

Ivantsova, E.U. Correlation analysis of tomato-fruit (*Lycopersicon esculentum* mill) yield traits, term-storage and biochemical features / Ivantsova E.U., Kilchevsky A.V. // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 7-12.

The present study has revealed the strong and medium negative correlation between long-term fruit storage and early yield; between long-term fruit storage and sugar content at the milk stage of tomato fruit; the medium positive correlation between long-term fruit storage and the total acid content at the milk stage of tomato fruit.

Key words: correlation, fruit storage, degree of ripeness.

УДК:575.133.018.634:[633.11+633.14]

Изменения в хлоропластном геноме альбиносных растений ярового тритикале, полученных в культуре пыльников *in vitro* / О.И. Зайцева [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С.13-19. Соавт.: Лемеш В.А., Мозгова Г.В., Кильчевский А.В.

Проведен анализ перестроек хлоропластного генома хлорофилл-дефектных растений-регенерантов, полученных в культуре пыльников *in vitro* гибридов и сортов ярового гексаплоидного тритикале. Исследование проводилось по 7-ми генам, изменения в которых могут быть связаны с возникновением явления альбинизма в культуре пыльников. Показано, что изменения пластома затрагивают 6 из 7-ми изученных генов. При этом, с наибольшей частотой не выявляется ген *atpB*, кодирующий β -субъединицу CF₁ комплекса АТФ-азы. Выявленные перестройки могут обуславливать возникновение альбиносных растений в культуре пыльников *in vitro*.

Ключевые слова: тритикале, культура пыльников; альбинизм; хлоропластный геном.

Changes in chloroplast genome of spring triticale albino plants produced in the *in vitro* anther culture / O.I. Zaitseva [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 13-19. Lemesh V.A., Mozgova G.V., Kilchevsky A.V.

Rearrangements of chloroplast genome were analysed in chlorophyll-deficient regenerant-plants produced in the *in vitro* anther culture of spring hexaploid triticale hybrids and cultivars. Tests were performed for seven genes, changes in which can be related to albinism emergence in the anther culture. Plastome changes were shown to affect six out of seven studied genes. Gene *atpB* encoding β -subunit of ATPase CF₁ complex was not revealed with the highest frequency. The detected rearrangements can give rise to albino plant emergence in the *in vitro* anther culture.

Key words: triticale, anther culute, albinism, chloroplast genome.

УДК: 631. 524. 01.:631. 524. 02

Петрова, Н.Н. Уточнение метода ортогонального анализа в селекции растений / Н.Н. Петрова, С.В. Егоров // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С.20-29.

В статье обсуждаются внесенные дополнительные элементы к методу ортогонального анализа. По отношению к ранее представленной модели В.А. Драгавцева нами внесены уточнения – нормализация данных, среднее квадратическое отклонение и возможность моделирования желаемого сочетания признаков с оценкой направленности отклонения показателя в сторону селекционной значимости. Разработан способ расчета, позволяющий выделять генотипы по отклонению показателей (сдвига) от основных характеристик – зоны с определенным сочетанием селекционного и фонового признаков. Составлен алгоритм вычисления параметров ортогональной регрессии для нахождения генотипов с оптимальным сочетанием признаков, обеспечивающих прирост продуктивности (усиление обратной корреляции между массой зерна и массой соломы у пшеницы). Предложенный вариант уточнения повышает эффективность и надежность селекционного отбора.

Ключевые слова: ортогональная регрессия, нормализация данных, аттракция, адаптивность, фоновый признак, селекционный признак

Petrova, N.N. Precise definition of the orthogonal analysis method in breeding of plants / N.N. Petrova, S.V. Egorov // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 20-29.

The introduced additional details to the orthogonal analysis method are discussed in the article. In relation to the earlier model presented by V.A. Dragavtsev we have introduced more precise definitions i.e. – normalisation of data, mean-

square deviation and possibility of modelling a desirable combination of characters with the estimation of the orientation of a parameter deviation towards the selection significance. The way of calculation which allows selection of genotypes according to the deviation of parameters (shift) from the basic characteristics – zones with a certain combination of selection and background characters was developed. The algorithm of calculation for the parameters of orthogonal regression in order to find genotypes with an optimum combination of the characters that provide a rise in efficiency (strengthening of invert correlation between grain weight and straw weight in wheat) is made. The proposed variant of definition raises the efficiency and reliability of selection.

Key words: orthogonal regression, data normalization, attraction, adaptivity, background character, selection character.

УДК 579.64:632

Оценка влияния фитотоксичных псевдомонад на развитие сахарной свеклы различных генотипов / А.Н. Перебитюк [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С.30-38. Соавт.: Конюшквич Л.Н., Машковская Г.В., Пучко В.Н.

Проведена оценка фитотоксичности штаммов псевдомонад, степени их негативного влияния на развитие проростков различного генетического материала сахарной свеклы.

В структуре популяции псевдомонад с производственных посевов от 27 до 38% выделенных штаммов оказывают отрицательное влияние на всхожесть, снижают вес проростков, уменьшают длину корней растений сахарной свеклы сортов и гибридов отечественной и зарубежной селекции.

Ключевые слова: псевдомонады, фитотоксичность, сахарная свекла.

Estimation of Phytotoxic Pseudomonade Effect on Development of Sugar Beet of Different Genotypes / A.Perebityuk [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 30-38 Konyushkevich L., Mashkovskaya G., Puchko V.

The article deals with estimation of pseudomonade strain phytotoxicity, the degree of their negative effect on the development of seedlings from different genetic material of sugar beet. In the structure of the pseudomonade population from industrial sowings, 27-38% of isolated strains exert a negative effect on germination, decrease seedling weight, reduce plant root length of sugar beet cultivars and hybrids of home and foreign breeding.

Key words: pseudomonades, phytotoxicity, sugar beet.

УДК 575.22: 631.527: 633.413

Милько, Л.В. / Оценка полиморфизма днк гиногенетических линий и сорта белорусская односемянная 69 сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью гард-маркеров // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Т. 10. Минск, 2009. С 39-47. Соавт: Свиршевская А.М., Кильчевский А.В.

С использованием набора ДНК маркеров была исследована вариабельность более 50 RAPD локусов генома у близкородственных генотипов сахарной свеклы - гиногенетических линий, полученных в культуре неоплодотворенных семязпочек *in vitro* растений сорта Белорусская односемянная 69 (2x) и у самого сорта. Апробированы 10 произвольных декамерных праймеров и отобраны 5 из них, позволяющих выявить полиморфные локусы и уникальные ампликоны, лежащие в основе оценки генетического сходства/различия и возможности дифференциации близких в генетическом отношении генотипов свеклы. Отмечена тенденция по кластеризации линий одного происхождения (компонент I сорта Белорусская односемянная 69), одного уровня пloidности (гаплоидных) и в зависимости от варианта репродукции линий (семенами или микроклонированием *in vitro*). Сделан вывод о необходимости увеличения количества праймеров и выборок образцов ДНК для целей генотипирования у сахарной свеклы с помощью RAPD-маркеров. Средний уровень полиморфизма ДНК в RAPD-локусах при популяционном анализе сорта Белорусская односемянная 69 при использовании 5 праймеров составил 44,6%.

Ключевые слова: полиморфизм ДНК, RAPD-маркеры, гиногенетические линии, сахарная свекла

Assessment of DNA polymorphism in gynogenetic lines and cultivar Belorusskaya odnosemyannaya 69 of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) with RAPD markers / Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 39-47. Milko L.V., Svirshchevskaya A.M., Kilchevsky A.V.

Variability of above 50 RAPD genome loci was investigated with a set of DNA markers in close-related genotypes of sugar beet – gynogenetic lines produced in a culture of unfertilized seed buds in the *in vitro* plants of cv. Belorusskaya odnosemyannaya 69 (2x) and in the cultivar itself. Ten random decadimensional primers were evaluated and five of them, enabling detection of polymorphic loci and unique amplicons being the basis of assessing genetic similarity/dissimilarity and the possibility of differentiation among sugar beet genotypes similar in genetic aspect, were selected. The trend for clusterization of lines of similar origin (component I of cv. Belorusskaya odnosemyannaya 69), of similar ploidy level (haploid) and depending on the variant of line reproduction (by seeds or by *in vitro* microcloning) was noted. The necessity for increasing the number of primers and samples of DNA accessions for genotyping purposes in sugar beet with RAPD markers was concluded. The average level of DNA polymorphism in RAPD loci was 44.6% under population analysis of cv. Belorusskaya odnosemyannaya 69 and application of 5 primers.

Key words: DNA polymorphism, RAPD markers, gynogenetic lines, sugar beet.

УДК 575.858 + 631.523.55 + 631.527.5: 582.542.1

Взаимодействие базового и рекомбинантного геномов в ходе формирования и функционирования генома тетраплоидных тритикале / Н.И. Дубовец [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 38-47. Соавт.: Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И., Бондаревич Е.Б.

Исследованы особенности взаимодействия базового и рекомбинантного геномов в составе генома тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов. Установлено, что не только геном ржи, выступающий в роли базового, оказывает модифицирующее действие на функциональную активность хромосом пшеницы, но и рекомбинантный пшеничный геном способен влиять на экспрессию генома ржи. Сделано заключение о наличии сложных взаимодействий между базовым и рекомбинантным геномами 4х-тритикале, отражающих становление в гибридном организме единой генетической системы регуляции жизненно важных процессов.

Ключевые слова: рекомбинантный геном, интрогрессии генетического материала, гомеологичное спаривание хромосом, ядрышкообразующие хромосомы, сайленсинг, дифференциальное окрашивание хромосом (С-бэндинг).

Interaction of basic and recombinant genomes during formation and functioning of tetraploid triticale genome / N.I. Dubovets, [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 38-47. Sycheva Y.A., Solovey L.A., Shtyk T.I., Bondarevich Y.B.

Peculiarities of interaction between basic and recombinant genomes were studied in genome composition of tetraploid wheat-rye amphidiploids. It was revealed that not only rye genome, acting as a basic one, exerted a modifying action on functional activity of wheat chromosomes, but also a recombinant wheat genome was able to influence rye genome expression. It was concluded about the presence of complex interactions between basic and recombinant genomes of 4x-triticale, displaying formation of a common genetic system for controlling vital processes in a hybrid organism.

Key words: recombinant genome, genetic material introgressions, homeologous pairing of chromosomes, nucleolar chromosomes, silencing, differential staining of chromosomes (C-banding).

УДК 575.1/.2'316:[633.14+633.11]

Люсиков, О. М. Цитогенетические факторы и механизмы формирования гамет различного хромосомного состава у ржано-тритикальных гибридов F_1 (rrabr, $5x=35$) / Люсиков О. М., Гордей И. А. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 58-68.

В статье представлены результаты исследований формирования гамет различного хромосомного состава у ржано-тритикальных гибридов F_1 (RRABR, $5x=35$) в процессе создания нового типа ржано-пшеничных амфидиплоидов с ржаным типом цитоплазмы – секалотритикум (*XSecalotriticum*, RRAABB, $2n=6x=42$). У пентаплоидов F_1 проведен анализ особенностей микроспорогенеза в зависимости от генотипической специфичности взаимодействия генетических систем контроля мейоза пшеницы (Ph-гены, I/Edu и др.) и ржи (Sy, P/Edu и др.). Выявленные особенности сегрегации и элиминации хромосом исходных геномов обусловлены различиями их спаривания, синапсиса и полярной ориентации центромер в профазе мейоза. Они послужили теоретическим и экспериментальным обосновыванием цитогенетических факторов и механизмов гаметогенеза у ржано-тритикальных гибридов F_1 . Результаты исследований способствуют повышению эффективности методов получения секалотритикум и создания их генетического разнообразия.

Ключевые слова: ржано-тритикальные гибриды F_1 , секалотритикум, секалотрикум, цитогенетика, мейоз, микроспорогенез, синапсис, полярная ориентация центромер, сегрегация хромосом, гаметогенез.

Lyusikov, O. M. Cytogenetic factors and mechanisms of gamete formation with different chromosome composition in rye-triticale hybrids F_1 (rrabr, $5x=35$) / Lyusikov O. M., Gordey I.A. // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 58-68.

The article presents the research results of gamete formation with different chromosome composition in rye-triticale hybrids F_1 (RRABR, $5x=35$) during developing a new type of rye-wheat amphidiploids with a rye type of cytoplasm – secalotriticum (*X Secalotriticum*, RRAABB, $2n=6x=42$). Analysis of microsporogenesis features was made in pentaploids depending on genotypic specificity of interaction between genetic systems of meiosis control in wheat (Ph-genes, I/Edu, etc.) and rye (Sy, P/Edu, etc.). The revealed features of chromosome segregation and elimination in initial genomes are caused by differences in their mating, synapsis and polar orientation of centromeres in meiosis prophase. They were theoretical and experimental grounds of cytogenetic factors and mechanisms of gametogenesis in rye-triticale hybrids F_1 . The research results favour an increase in the efficiency of methods for producing secalotriticum and developing its genetic diversity.

Key words: rye-triticale hybrids F_1 , secalotriticum, secalotricum, cytogenetics, meiosis, microsporogenesis, synapsis, polar orientation of centromeres, chromosome segregation, gametogenesis.

УДК 631.523:633.14 «324»:631.527.5

Шимко, В.Е. Генетические основы создания и использования самофертильных линий озимой ржи в селекции на гетерозис / Шимко В.Е., Гордей И.А. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 69-79.

Проведены исследования по созданию нового генофонда самофертильных линий озимой ржи для использования в селекции на гетерозис. Выделены маркированные самофертильные линии, обеспечивающие гетерозисный эффект при скрещивании как с популяционными сортами, так и с линиями ЦМС Р- и G-типов. Самофертильные линии 12,

23, 26, 51-16 следует использовать в качестве отцовских компонентов при создании гетерозисных гибридов F_1 . Создание гетерозисных гибридов F_1 с использованием ЦМС Р- и G-типов и современных популяционных сортов позволяет достичь высокого уровня восстановления фертильности пыльцы и эффекта гетерозиса по зерновой продуктивности. Положительный эффект истинного гетерозиса изучаемых гибридов обусловлен, по нашему мнению, накоплением компенсационного комплекса генов (ККГ) у линий на фоне ЦМС-мутаций. Эффект гетерозиса у гибридов зависит от степени совместимости компонентов гибридизации и от их зерновой продуктивности. Экспериментально обоснована перспективность использования самофертильных линий озимой ржи в гетерозисной селекции.

Ключевые слова: рожь, самофертильные линии, гетерозис.

Shimko, V.E. Genetic principles of developing and using self-fertile lines of winter rye in breeding for heterosis / Shimko V.E., Gordei I.A. // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. Vol. 10. Minsk, 2009. P.69-79.

Investigations on developing a new gene pool of winter rye self-fertile lines were carried out for application in breeding for heterosis. Marked self-fertile lines, ensuring a heterotic effect in crossing with both population cultivars and the lines of CMS P- and G- types, were selected. Self-fertile lines 12, 23, 26, 51-16 should be used as paternal components in developing heterotic hybrids F_1 . Development of the heterotic hybrids F_1 using CMS P- and G- types and the present population cultivars allows achievement of a high level of pollen fertility restoration and the heterosis effect for grain productivity. A positive effect of the real heterosis in the hybrids studied is caused, in our opinion, by accumulation of compensating gene complex (CGC) in the lines against the background of CMS-mutations. The heterosis effect in hybrids depends upon the degree of compatibility of hybridization components and upon their grain productivity. Prospects of using self-fertile lines of winter rye in heterosis breeding were experimentally substantiated.

Key words: rye, self-fertile lines, heterosis.

УДК 616-007-053.1

Геномные болезни человека. Анализ локуса 22q11 / А.Д. Политыко [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* Т. 10. Минск, 2009. С. 80-88. Соавт.: Хурс О.М., Лир Т.

В работе представлена характеристика геномных заболеваний. Описаны геномные болезни, генетический дефект при которых локализован в области генома человека 22q11. Рассмотрены молекулярные и цитогенетические механизмы геномных болезней, распространённость в популяции, применяемые молекулярно-цитогенетические методы лабораторной диагностики генетического дефекта. Проанализирован собственный материал, представленный наблюдениями синдрома Ди Джорджи/велокардиофациальный, синдрома кошачьего глаза, синдрома Эмануэля или синдрома der (22) и другими аномалиями кариотипа у белорусских пациентов.

Ключевые слова: инвертированная дуплицированная хромосома, добавочная малая маркерная хромосома, синдром Ди Джорджи/велокардиофациальный, синдром кошачьего глаза, синдром Эмануэля.

Human genomic disorders. Analysis of locus 22q11/ A.D. Polityko [et al] // *Molecular and Applied Genetics: Proceedings*. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 80-88. Khurs O.M., Thomas Liehr.

We present here the characterization of genomic disorders. The abnormalities of karyotype and the genetic defect in the region 22q11 are discussed. The molecular cytogenetic mechanisms of genomic disorders, their incidence in the population, and the laboratory methods of molecular cytogenetic diagnostics of the genomic defects are described. The data of analysis of Di George/velocardiofacial syndrome cases, cat eye syndrome and the cases of Emanuel syndrome as well as other abnormalities of 22q11 region of human genome in Belarus patients are presented.

Key words: inverted duplicated chromosome, supernumerary small marker chromosome, Di George/velocardiofacial syndrome, cat eye syndrome, Emanuel syndrome.

УДК [51-76+004.9]:[576.535+61+636.2+615]

Разработка методов компьютерной видеомикроскопии живых клеток для медицинской трансплантологии, биотехнологии животных и токсикологии / О.В. Квитко [и др.] // *Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр.* Т. 10. Минск, 2009. С. 89-100. Соавт.: Конева И.И., Шейко Я.И., Трусова В.Д., Шевцова С.Н., Сапун А.С., Дромашко С.Е.

Компьютерная видеомикроскопия живых клеток находит все большее применение в разработке клеточных технологий. Выполняемый с помощью данного метода анализ индивидуальных клеток и их клоновых потомств во времени позволяет изучать пролиферацию и клеточную гибель (апоптоз), а также эпигенетические процессы при клеточной дифференцировке. Фолликулы волос, получаемые нехирургическим путем, являются перспективным источником аутологичных (собственных) клеток для лечения ряда заболеваний посредством клеточной трансплантации. Продемонстрировано использование видеомикроскопии живых клеток при получении клеточной линии из фолликулов волос человека, а также при подборе условий культивирования, индуцирующих симметричную нейральную дифференцировку данных клеток. Культуры клеток репродуктивного тракта являются основой клеточных технологий в животноводстве. Обнаружено, что жидкость из фолликулов яичника коров стимулирует митотические деления постаревших крупных клеток гранулезы, что позволило получить долговременные культуры гранулезных клеток. Клеточные культуры применяются для токсикологического тестирования. Изученный с помощью витальной видеомикроскопии процесс клазматоза (отделения фрагментов цитоплазмы) был использован в качестве теста, выявляющего эффекты противоопухолевого препарата диазиквона на клетки A549.

Ключевые слова: компьютерная видеомикроскопия, пролиферация, апоптоз, дифференцировка, старение, иммортализация, клеточные клоны, стволовые клетки.

Elaboration of computer videomicroscopy methods of living cells for medical transplantology, animal biotechnology and toxicology / O.V. Kvitko [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 89-100. Koneva I.I., Sheiko Y.I., Trusova V.D., Shevtsova S.N., Sapun A.S., Dromashko S.E.

Computer videomicroscopy of living cells is increasingly used in developing cell technologies. Videomicroscopic monitoring of single cells and their clonal progenies in time allows study of epigenetic processes under cell differentiation, proliferation and cell death (apoptosis). Hair follicles are easily obtained without surgical intervention and constitute a perspective source of autologous (own) cells for treatment of different diseases by means of cell transplantation. Computer videomicroscopy of living cells was used for producing a cell line from human hair follicles and selecting culture conditions that induce a symmetrical neural differentiation of these cells. Reproductive tract cell cultures are the basis of cell technologies in animal husbandry. Fluid from cow ovary follicles was revealed to stimulate mitotic divisions of big senescent granulose cells that enabled production of long-term cultures of these cells. Cell cultures are applied for toxicological testing. The process of clasmatosis (detachment of cytoplasmic fragments) studied by vital videomicroscopy was utilized for testing effects of the antitumoral drug diaziquone on the cell line A549.

Key words: computer videomicroscopy, proliferation, differentiation, senescence, immortalization, cell clones, stem cells.

УДК: 575.224.4/575.224.6

Стимуляция репарации окислительных повреждений днк в лимфоцитах человека *in vitro* с использованием одного из перспективных производных 1,4-дигидропиридина / Н.И. Рябоконт [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 101-107. Соавт.: Никитченко Н.В., Гончарова Р.И.

Ранее нами показано, что препараты из серии 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) могут стимулировать скорость и эффективность репарации ДНК в линиях клеток человека через регуляцию активности полимеразы поли(ADP-рибозы). Стимуляция репарационного процесса под влиянием 1,4-ДГП-ов была выявлена и для лимфоцитов периферической крови одного донора после гамма-облучения и обработки этилметансульфонатом *in vitro*. В настоящем исследовании мы обнаружили, что один из перспективных препаратов этой серии показывает значительное 30% увеличение скорости репарации и 50% увеличение эффективности репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови группы здоровых доноров после окислительного стресса *in vitro*. Наблюдаемая стимуляция репарации ДНК сопровождается ростом выживаемости лимфоцитов после генотоксического стресса. Таким образом, мы приходим к выводу, что этот и другие препараты этой серии могут быть далее изучены как медицинские препараты против различных заболеваний, сопровождающихся увеличенным уровнем окислительных повреждений ДНК.

Ключевые слова: производные 1,4-дигидропиридина, клетки человека, лимфоциты, окислительные повреждения ДНК, репарация ДНК, выживаемость.

Stimulation of repair of oxidative DNA damages in human lymphocytes *in vitro* with one of the promising derivatives of 1,4-dihydropyridine / Ryabokon N.I. [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 101-107. Nikitchenko N.V., Goncharova R.I.

Previously we showed that the compounds of 1,4-dihydropyridine (1,4-DHP) series could stimulate DNA repair rate and efficiency in human cell lines via regulation of poly(ADP-ribose) polymerase activity. Stimulation of repair process under the effects of 1,4-DHP was revealed in human peripheral blood lymphocytes of one donor after gamma-irradiation and ethylmethane sulfonate treatment *in vitro*. In the present study, we have found that one of the promising compounds of this series shows a considerable 30% increase in DNA repair rate and 50% increase in DNA repair efficiency in peripheral blood lymphocytes of a group of healthy donors after oxidative stress *in vitro*. The observed stimulation of DNA repair is accompanied by the increased survival of lymphocytes after genotoxic stress. Thus, we conclude that this and other compounds of this series can further be studied as medicines against various diseases with increased level of oxidative DNA damages.

Key words: 1,4-dihydropyridine series, human cells, lymphocytes, oxidative DNA damages, DNA repair, survival.

УДК 575.224.46:577.2.08

Метод ДНК-комет в выявлении геномной нестабильности. Мониторинг состояния генома у работников ОАО «МАЗ» / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 108-113. Соавт.: Смаль М.П., Кужир Т.Д., Ершова-Павлова А.А., Кудрейко Н.П., Першин И.Г., Савочкин В.С., Юревич Л.П., Гончарова Р.И.

Начато изучение состояния генома с помощью метода ДНК-комет у лиц, занятых на производстве. Из работников АОА МАЗ сформирована группа внутреннего контроля. Добровольцы, включенные в эту группу, не имели непосредственного контакта с вредными факторами производственной среды. Средние показатели (частота эндогенных повреждений ДНК, частота повреждений ДНК, индуцированных *in vitro* пероксидом водорода, эффективность репарации ДНК) в этой группе находятся в пределах значений, установленных ранее для здоровых доноров. Не выявлена связь частоты эндогенных/экзогенных повреждений ДНК с возрастом. Показана зависимость остаточного уровня индуцированных повреждений ДНК от эффективности репарации ДНК. Установленные показатели и закономерности свидетельствуют об адекватности этой группы для последующего сравнительного исследования состояния генома в группе работников, профессионально контактирующих с промышленными загрязнителями.

Ключевые слова: мутагены окружающей среды, геномная нестабильность, лимфоциты человека, метод ДНК-комет.

The Comet-assay in revealing genome instability. Monitoring of the genome status in workers of AOA MAZ./ N.V. Savina [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 108-113. Smal M.P., Kuzhir T.D., Ershova-Pavlova A.A., Kudreiko N.P., Pershin I.G., Savochkin V.S., Yurevich L.P., Goncharova R.I.

Study on the genome status using Comet assay in people employed has been started. The internal control group was formed from volunteer workers of MAZ (Minsk Automobile Plant), who do not directly contact with deleterious industrial environmental factors. Average parameters (the frequencies of endogenous and *in vitro* H₂O₂-induced DNA damages as well as DNA repair efficiency) were in the range of values earlier established for healthy donors. The relationship between frequencies of endogenous/exogenous DNA damages and age was not revealed. Dependence of the residual level of induced DNA damages on DNA repair efficiency was established. The parameters and patterns found indicate adequacy of this group for further comparative investigation of the genome status in the group of workers exposed to industrial pollutants occupationally.

Key words: environmental mutagens, genome instability, human lymphocytes, Comet-assay.

УДК 616.36+616.831] – 008.64 – 074/078:575.24/.25(476)

Дубовик, С.В. Применение метода прямого секвенирования для определения редких мутаций гена АТР7В у белорусских пациентов с болезнью Коновалова-Вильсона / С.В. Дубовик, Н.Б. Гусина // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 114-118.

Болезнь Коновалова-Вильсона (БКВ) – аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся нарушением транспорта меди и приводящее к токсической аккумуляции меди в печени, мозге и других органах. Развитие БКВ обусловлено мутациями в гене АТР7В. Известно более 300 мутаций гена АТР7В. Спектр мутаций гена имеет свои особенности для конкретной популяции. Проведенные ранее исследования показали, что наиболее частой мутацией гена АТР7В у белорусских пациентов с БКВ является Н1069G (57% всех мутантных аллелей). Нами был выполнен анализ мутаций в 8 и 15 экзонах гена АТР7В методом прямого секвенирования у 18 пациентов с БКВ. Два пациента оказались гетерозиготными носителями инсерции 2299incC. В трех образцах ДНК мы выявили полиморфизм С→Т в 767 кодоне. У двух пациентов мы обнаружили трансверсию С→А в 745 кодоне, которая предположительно является ранее не описанной мутацией гена АТР7В. Два пациента были гетерозиготными по мутации I1102T. Делеция 3400delC была обнаружена у одного пациента.

Ключевые слова: болезнь Коновалова-Вильсона, ген АТР7В, секвенирование.

Dubovick, S.V. / Detection of АТР7В gene mutations by direct sequencing in Belarusian patients with Wilson disease / S.V. Dubovick, N.B. Gusina // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 114-118.

Wilson disease (WD) is an autosomal recessive disorder of copper transport. The disorder is characterized by toxic accumulation of copper in the liver and subsequently in the brain and other organs. The disease is caused by mutations in the АТР7В gene. More than 300 mutations were identified in the АТР7В gene. Spectrum of mutation appears to be population specific. Previously we reported that among Belarusian WD patients the most common mutation was Н1069G (57 % of all 82 alleles). This study presents the results of mutation analysis of 8 and 15 exons patients performed by direct sequencing in 18 WD. Two patients appear to be heterozygous for the insertion 2299incC. We revealed polymorphism С→Т in codon 767 in three samples. In two patients we detected С→А transversion in codon 745. We suppose that this substitution is a novel mutation. Two patients were heterozygous for I1102T and 3400delC was revealed in one individual.

Key words: Wilson disease, АТР7В gene, sequencing.

УДК 575.224.4/575.224.6

Радиопротекторная активность антимуtagена дигидропиридинового ряда в зависимости от генотипа клеток млекопитающих / Н.В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 119-130. Соавт.: Даливеля О.В., Смаль М.П., Кужир Т.Д., Воеводска М., Бурачевска И., Градска И., Гончарова Р.И.

Исследована радиопротекторная активность препарата дигидропиридинового ряда на клеточной линии лимфомы мыши L5178Y с использованием нейтральной версии метода ДНК-комет, микроядерного теста и тестов на выживаемость и пролиферативную активность клеток. Установлена способность препарата снижать частоту двунитевых разрывов ДНК и цитогенетических повреждений, индуцированных рентгеновским излучением. Положительные эффекты зарегистрированы при концентрациях 10⁻⁴ и 10⁻⁹ М в зависимости от генотипа клеток: генопротекторная и антикластогенная активность реализовалась при полноценной репарации ДНК и нормальном метаболизме поли-ADP-рибозы. Сравнение эффектов препарата в различных тест-системах на клетках животных и человека выявило высокую эффективность препарата против окислительных повреждений ДНК. Обсуждаются механизмы действия и перспективы практического применения изученного соединения.

Ключевые слова: ДНК-репарация, метод комет, лимфома мыши L5178Y, 1,4-дигидропиридин, цитотоксичность, микроядра, радиозащитный эффект.

Radioprotective activity of the antimutagen of 1,4-dihydropyridine series depending on genotype of mammalian cells/ N.V. Savina [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P.119-130. Dalivelya O.V., Smal M.P., Kuzhir T.D., Woewodska M., Gradska I., Buraczewska I., Goncharova R.I.

Radioprotective activity of the 1,4-dihydropyridine derivative was examined in murine lymphoma cell line L5178Y using the neutral version of the Comet assay, the micronucleus test and tests for cell survival and proliferation. It was

established that the compound decreased the level of DNA double strand breaks and cytogenetic injuries induced by X-radiation. Positive effects were revealed in the range of concentrations 10^{-9} – 10^{-4} M depending on the cell genotype: namely, genoprotective and anticlastogenic activities were realized against the background of DNA repair proficiency and normal metabolism of poly-ADP-ribose. The comparison of the compound effects in the various test-systems on the animal and human cells showed the high compound efficiency against DNA oxidative damages. Mechanisms of the compound action as well as prospects of its application are discussed.

Key words: DNA-repair, Comet-assay, murine lymphoma cell line L5178Y, 1,4-dihydropyridine, cytotoxicity, micronuclei, radioprotective effect.

УДК 575.1/2:316:[546.26:541.6]

Цитогенетические эффекты углеродных наночастиц в клетках костного мозга мышей / Л.Н. Кострова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 131-135. Соавт.: Ушакова Д.А., Аношенко И.П.

Изучено влияние углеродных нанотрубок в разных дозах и при разных способах введения в организм (пероральный и внутрилегочный) на мутационный процесс в клетках костного мозга мышей. Показано, что углеродные наночастицы в малых дозах не вызывают кластогенных эффектов, однако, при использовании их в высоких дозах – 50 мг/кг при пероральном введении, а также 200 и 500 мг/л воздуха при вдыхании выявлены статистически достоверные цитогенетические эффекты в клетках костного мозга мышей. Результаты имеют практическое значение для разработки рекомендаций по безопасной работе с наночастицами и нанопорошками.

Ключевые слова: наночастицы, костный мозг, хромосомные aberrации, мыши.

Cytogenetic effects of carbon nanoparticles in bone marrow cells of mice / L.N. Kostrova [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 131-135. Mosse I.B., Ushakova D.A., Anoshenko I.P.

The article concerns the study on the influence of carbon nanotubes at different doses and by various methods of introduction into organism (peroral and intrapulmonary) on the mutation process in mouse bone marrow cells. It was shown that nanoparticles at low doses did not cause mutagenic effects, however, statistically significant cytogenetic effects in mouse bone marrow cells were observed by their use at high doses – 50 mg/kg under peroral introduction and inhalation of 200 and 500 mg/kg of air. The results are of practical importance for working out recommendations of safe work with nanoparticles and nanopowders.

Key words: nanoparticles, bone marrow, chromosome aberrations, mice.

УДК 616.8-07:575.113

Определение экспансии CTG-повторов в гене DMPK у пациентов с миотонической дистрофией 1 типа / Т.В. Осадчук // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 136-141. Соавт.: Моссэ К.А., Румянцева Н.В.

Миотоническая дистрофия 1 типа - мультисистемное заболевание с аутомно-доминантным типом наследования. У больных имеет место экспансия tandemных тринуклеотидных повторов CTG, расположенных в 3'-нетранслируемой области гена DMPK на хромосоме 19q13.2-q13.3. Мы обследовали 75 пациентов из 36 семей с клиническим диагнозом миотоническая дистрофия или с подозрением на нее. По результатам ДНК-анализа было выявлено три семьи (3 про-банда и 9 членов их семей), в которых наблюдалась экспансия CTG-повторов. Мы идентифицировали две небольшие экспансии с 70 и 86 CTG-повторами у двух мужчин из разных семей. По результатам ПЦР-анализа было отобрано 10 образцов с высоким риском экспансии, которая была подтверждена методом блот-гибридизации по Саузерну.

Ключевые слова: миотоническая дистрофия, CTG-повторы, болезни экспансии, ген DMPK.

Determination of the expansion of CTG-repeats in DMPK gene in the patients with myotonic dystrophy of type 1 / Osadchuk T. [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 136-141. Mosse K., Rumyantseva N.

Myotonic dystrophy of type 1 (DM1) is an autosomal dominant, multisystemic disease. It is the most common form of adult muscular dystrophy. DM is caused by expansion of CTG trinucleotide repeats located in the 3' untranslated region of the myotonin protein kinase (DMPK) gene on chromosome 19q13.2-q13.3. Abnormal repeats expand from 50 to several thousands. Our specially designed PCR-based protocol allows amplification of normal-sized alleles and small expansions. Products were analysed by automated capillary electrophoresis on the ABI Prism 310. We examined 75 patients from 36 families showing different symptoms related to myotonic dystrophy. We found two small expansions with 70 CTG repeats and 86 CTG repeats in two affected men from two different families. PCR analysis also shows the high risk of the DMPK gene mutation in 10 patients from 3 families, further confirmed by the Southern blot.

Key words: myotonic dystrophy, CTG-repeats, expansion diseases, DMPK gene.

УДК 616.8-053.1-071/.078

Идентификация дупликации гена PMP22 у пациентов с невралгической амиотрофией Шарко-Мари-Тус / Т.В. Осадчук [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 142-146. Соавт.: Моссэ К.А., Румянцева Н.В.

Невралгическая амиотрофия Шарко-Мари-Тус (СМТ) - генетически гетерогенная группа наследственных заболеваний периферической нервной системы. Примерно в 70% семей с СМТ 1 типа обнаруживают дупликацию гена

PMP22, являющуюся причиной СМТ 1А типа. Для идентификации дупликации использован метод количественного определения аллелей внутрилокусных микросателлитных маркеров. Обследовано 414 человек (238 пробандов и 176 членов их семей). Дупликация гена PMP22, являющаяся причиной СМТ 1А, была обнаружена у 65 человек (37 пробандов и у 28 членов их семей), что позволило установить точную причину неврологической патологии.

Ключевые слова: невральная амиотрофия Шарко-Мари-Тус, наследственная моторно-сенсорная нейропатия, ген PMP22, дупликация.

Identification of PMP22 gene duplication in patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy / Т. Osadchuk [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 142-146. Mosse K., Rumyantseva N.

Charcot-Marie-Tooth disease of type 1 (CMT1) is the most common hereditary peripheral neuropathy. One of the most effective strategies for molecular diagnosis of CMT1A is based on quantitative PCR analysis of short tandem repeats (STRs). DNA-markers were tested in a group of 238 patients with presumable clinical diagnoses of neuropathy and 176 their family members. We identified the PMP22 gene duplications in 37 families with a total number of 65 affected individuals. In all positive cases we were able to detect three different alleles of at least one STR and clear semiquantitative dosage effect in other.

Key words: Charcot-Marie-Tooth neuropathy, hereditary motor and sensory neuropathy, PMP22 gene, duplication.

УДК 576.851.49:663.1

Галиновский, Д.В. Эффект повышенной дозы генов crt-кластера в продукции каротиноидных пигментов штаммами *Pantoea agglomerans* / Д.В. Галиновский, А.Н. Евтушенко // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 147-154.

Плазмиды, несущие гены геранилгеранилпирофосфат синтетазы (*crtE*) и фитоин синтетазы (*crtB*), фитоин-дегидрогеназы (*crtI*), вводили в штаммы *P. agglomerans*, продуцирующие различные каротиноидные пигменты. Введение плазмиды с геном *crtE* в штамм, который синтезирует зеаксантин, увеличивает его продуктивность на 80%. Введение дополнительной копии *crtE* гена в штамм, который продуцирует ликопин, существенным образом не повышает его продуктивность, а увеличение дозы *crtB* и *crtI* генов снижает выход ликопина на 20%. Определили, что повышение дозы *crtB*, *crtE* и *crtI* генов увеличивает выход пигмента у зеаксантина и β-каротин синтезирующих бактерий. Продуктивность бактерий синтезирующих ликопин может снижаться при дополнительной экспрессии *crtB* и *crtI*.

Ключевые слова: каротиноиды, *Pantoea*, уровень синтеза пигментов.

Galinovskiy, D.V. The effect of the higher dose of genes from crt-cluster in production of carotenoids pigment in *Pantoea agglomerans* strains. / D.V. Galinovsky, A.N. Evtushenkov // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 147-154.

In this work, we have studied the influence of the plasmid carrying a geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and the plasmid with phytoene synthase (*crtB*) and phytoene desaturase (*crtI*) genes on the pigment level in *P. agglomerans* strains which cumulate different carotenoids. We have demonstrated that increasing dose of *crtE* gene leads to a rise in the pigment yield by 80% in zeaxanthine producing strain. The introduction of additional copy of *crtE* gene into lycopene producing strain of *P. agglomerans* does not change considerably the pigment level, while the plasmid with *crtB* and *crtI* genes decreases the lycopene yield by 20%. We have revealed the rise of dose of *crtB*, *crtE* and *crtI* genes increases pigment level in zeaxanthine and β-carotene producing strains, and the pigment yield in lycopene producing strain is reduced under additional expression of *crtB*, and *crtI*.

Key words: carotenoids, *Pantoea*, pigment synthesis level.

УДК 616.8 - 07:575.113

ДНК-диагностика мышечной дистрофии Дюшенна-Бекера в Беларуси: анализ делеций экзонов гена DMD / С.О. Мясников [и др.]. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 155-160. Сост.: Гусина Н.Б., Наумчик И.В., Хмель Р.Д., Румянцева Н.В.

Прогрессирующая мышечная дистрофия Дюшенна-Бекера (МДДБ) - наиболее частая форма мышечных дистрофий у детей наследуется по X-сцепленному рецессивному типу. Мышечная дистрофия Дюшенна и мышечная дистрофия Бекера - аллельные заболевания, причинами которых являются мутации в гене дистрофина (DMD) расположенном в хромосомном локусе Xp21. Наиболее частый тип мутаций – делеции экзонов гена DMD. Проведен анализ частот делеций экзонов и их распределение в группе из 53 белорусских пациентов методом мультиплексной ПЦР. Делеции выявлены у 21 из них, что составляет 40%. Самой частой оказалась делеция 48 экзона.

Ключевые слова: мышечная дистрофия Дюшенна-Бекера, ген DMD, делеция экзона

DNA diagnosis of Duchenne-Becker muscular dystrophy in Belarus: analysis of exon deletions of the DMD gene. / S.O. Miasnikov [et al.]. // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P.155-160. Gusina N.B. Naumchik I.V., Khmel R.D., Rumyantseva N.V. .

Duchenne-Becker muscular dystrophy is X-linked recessive muscle-wasting disease in infants. Duchenne and Becker muscular dystrophies are allelic diseases, caused by mutations in the DMD gene, located in locus Xp21. Exon deletions of the DMD gene are the most frequent type of mutations. We performed molecular-genetic analysis and

distribution of exon deletions in 53 Belarusian patients using mPCR method. Exon deletions were detected in 21 patients (40%). Deletion of 48 exon turned out the most frequent..

Keywords: Duchenne-Becker muscular dystrophy, DMD gene, exon deletion.

УДК 575.174.015.3:577.121:615.034

Генетический полиморфизм ферментов метаболизма лекарственных средств (*cyp1a2*, *cyp2d6*, *cyp2c9*, *gst*, *nat2* и *mdr1*) у жителей Беларуси / Н.Н. Чакова [и др.]. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 161-169. Соавт.: Михаленко Е.П., Крупнова Э.В., Чеботарева Н.В., Кругленко С.С., Золотухина С.Ф., Ковкова А.В.

Терапевтическая эффективность лекарственного средства (ЛС) и развитие неблагоприятных фармакологических ответов обусловлены, прежде всего, генетическими особенностями человека. При этом наибольшее значение имеют полиморфизмы генов ферментов биотрансформации. В данном сообщении представлены результаты анализа генетического полиморфизма ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2C9* – I фаза; *GST*, *NAT2* – II фаза; *MDR1* – III фаза) у жителей Беларуси.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ферменты биотрансформации ксенобиотиков.

Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *cyp1a2*, *cyp2d6*, *cyp2c9*, *gst*, *nat2* and *mdr1* in population of Belarus / N.N. Chakova [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 161-169. Mikhalenko E.P., Krupnova E.V., Chebotareva N.V., Kruglenko S.S., Zolotukhina S.F., Kovkova A.V.

Drug therapeutic efficiency and development of unfavourable pharmacologic responses are caused first of all by patient's genetic features. Polymorphisms of biotransformation enzyme genes are of the highest importance. The goal of our study was to analyse genetic polymorphism of some enzymes of xenobiotic biotransformation (*CYP1A2*, *CYP2D6*, *CYP2C9* – I phase, *GST*, *NAT2* – II phase, *MDR1* – III phase) in population of Belarus.

Key words: genetic polymorphism, enzymes of xenobiotic biotransformation.

УДК 616-076.5

Синдром Вильямса в Беларуси: молекулярно-цитогенетическое исследование и характеристика вариабельности фенотипических признаков / О.М. Хурс [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. научн. тр. Т. 10. Минск, 2009. С. 170-176. Соавт.: Политыко А.Д., Румянцева Н.В., Исакович Л.В., Кулак В.Д., Егорова Т.М., Наумчик И.В.

Синдром Вильямса (СВ) – генетическое заболевание, встречающееся с частотой 1 на 25 000–7 500 новорожденных. Причиной заболевания является микроделеция 7q11.23. Для проведения лабораторной диагностики использован метод FISH. Генетический дефект установлен у 24 из 39 обследованных пациентов (62%) с клинически предполагаемым диагнозом СВ. Все делеции включали ген *ELN*, а также как минимум захватывали участок критической области СВ между генами *FZD9* и *CYLN2*. Описана вариабельность фенотипических признаков у пациентов с СВ в белорусской популяции. Проведенное исследование позволило улучшить клиническую диагностику СВ и усовершенствовать медико-генетическое консультирование в Беларуси.

Ключевые слова: микроделеция, FISH, синдром Вильямса.

Williams syndrome in Belarus: molecular - cytogenetic investigation and characterization of variability of phenotypic features / O.M. Khurs, [et al] // Molecular and Applied Genetics: Proceedings. Vol. 10. Minsk, 2009. P. 170-176. Polityko A.D., Rumyantseva N.V., Isakovich L.V., Kulak V.D., Egorova T.M., Naumchik I.V.

Williams syndrome (WS) is a genetic disorder with an incidence of 1 per 25, 000–7, 500 newborn babies. Microdeletion 7q11.23 is a genetic defect of this disease. Molecular -cytogenetic method FISH was used for laboratory diagnostics of WS. Genetic defect was detected in 24 of the 39 examined patients (62%) with clinically presumable WS diagnosis.. All deletions included gene *ELN* and a site of the WS critical region between genes *FZD9* and *CYLN2*. The deletion arose sporadically in all cases. Variability of phenotypic characters was described in WS patients of the Belarusian population. The results obtained improved clinical diagnostics of WS and medico-genetic consulting process in Belarus.

Key words: microdeletion, FISH, Williams syndrome.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ

Статьи должны быть написаны в сжатой и ясной форме и содержать:

- соответствующий индекс универсальной десятичной классификации литературы (УДК);
- название на русском и английском языках;
- инициалы и фамилии авторов на русском и английском языках;
- полное название учреждений, в которых выполнялось исследование и их почтовые адреса;
- ключевые слова (3...5 слов);
- аннотацию на русском и английском языках (100—150 слов). Аннотация должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи;
 - текст статьи (стандартизировать, используя подзаголовки «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение»);
 - список использованных источников (оформляется в соответствии с Правилами ВАК, Приложение 2);
 - дату поступления статьи в редакцию.

Объем статьи должен составлять не менее 14 000 знаков, включая пробелы, до 10—12 страниц. Последняя страница статьи должна быть заполнена не менее чем на 4/5(!). После распечатки статья должна быть вычитана автором (авторами). На последней ее странице должна(ы) быть подпись(и) автора(ов). Текст статьи идентичного содержания представляется в электронном виде (по e-mail или на дискете) и на бумажном носителе в 2 экз. В виде отдельного документа представляются краткие сведения о каждом из авторов, включающие фамилию, имя, отчество, год рождения, сведения об образовании, служебные адреса, адрес электронной почты, ученую степень, ученое звание, должность, область научных интересов. Необходимо представить АКТ ЭКСПЕРТИЗЫ о возможности опубликования открытой печати (для статей).

1. Сдаваемый документ должен быть представлен в электронном виде в формате MS-Word. Название файлов — фамилия первого автора латинскими буквами.

2. Формат бумаги А4 (297×210 мм), ориентация — книжная.

3. Поля: верхнее — 2,5 см, нижнее — 2,5 см, левое — 2,5 см, правое — 2,5 см.

4. Основной текст статьи набирается шрифтом Times New Roman, размером 12 пт, в одну колонку с одинарным межстрочным интервалом. Не допускается использование табуляции или пробелов для обозначения первой строки абзаца.

5. Автоматическая расстановка переносов обязательна.

6. Название статьи набирать полужирным начертанием шрифта по центру. Переносы в заголовках не допускаются.

7. Все таблицы, содержащиеся в документе, должны быть реализованы средствами работы с таблицами редактора MS-Word. Не допускается вложение таблиц, созданных в других программах. Таблицы и графики должны быть пронумерованы и иметь названия. Не допускается размещение таблиц и рисунков в конце статьи (непосредственно перед списком литературы).

8. Вставка в текст символов (например, β , ϵ) производится только через опцию «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C^2 , C_4) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс\Нижний индекс». Греческие символы должны быть прямыми, латинские буквы набираются *курсивом*. Математические формулы (\lim , \sum , \sin , и т.д.) и цифры набираются прямым начертанием.

9. Печатать в сложных словах дефис (минерал-индикатор, К-пространство). Тире отбивают с обеих сторон неразрывным пробелом как знак препинания между словами: система «человек — машина», «май — июнь». Тире между цифрами, напр., 20—30 чел. — не отбивается.

10. Кавычки по всему тексту должны быть одного «рисунка». Кавычки не отбивают от заключенных в них слов.

11. При подготовке к печати графиков, блок-схем, диаграмм, файлы должны быть поименованы таким образом, чтобы было понятно, к какой статье они принадлежат и какими по порядку рисунками статьи являются. Графики должны иметь толщину всех линий не менее 0,2 пункта для четкого воспроизведения. Все надписи на рисунках должны быть набраны на компьютере и сгруппированы с рисунком, не допускается использование сканированного текста.

12. Необходимо предоставить электронные файлы фотоматериалов, а также распечатки лазерным принтером всех иллюстраций на листе формата А4. Отсканированные фотоиллюстрации серой, черно-белой цветовой модели должны иметь разрешение 600 dpi и формат TIFF.

13. Список цитированных источников располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок д.б. написаны внутри квадратных скобок. (напр.: [1]).

Научное издание

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ГЕНЕТИКА

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том 10

Ответственный за выпуск *Е.П. Нестерович*
Переводчик *Г.А. Мартысь*
Верстка *Е.П. Нестерович*
Технический редактор *В.Г. Гавриленко*

Подписано в печать 19.12.2009. Формат 60x84 1/8 Бумага офсетная. Гарнитура Roman.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 22,5. Уч. изд. л. 22,7. Тираж 100 экз. Заказ № _____

ИООО «Право и экономика» Лицензия ЛИ №02330/0056831 от 01.04.2004.

220072 Минск Сурганова 1, корп. 2. Тел. 284 18 66, 8029 684 18 66

Отпечатано на настольно - издательской системе XEROX в ИООО «Право и экономика»

Оригинал-макет подготовлен ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».