

УДК 576.312.31+612.112+616.151.1+612.68

## АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ХРОМАТИНА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ ПРИКАРПАТЬЯ

Козовый Р.В.

*ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет», Ивано-Франковск,  
e-mail: ruslan\_kozoviy@ukr.net*

Целью работы было установление особенностей структурно-функционального состояния хроматина и морфологии ядер лимфоцитов периферической крови у долгожителей Прикарпатья Украины. Проведен комплексный анализ показателей интерфазных ядер лимфоцитов периферической крови (индексов хроматизации, ядрышкового, морфологически измененных ядер) у 264 долгожителей (основная группа) и 218 человек зрелого возраста (группа сравнения) из трех экологических зон Прикарпатья. Установлена зависимость степени конденсации хроматина, активности ядрышкового аппарата и количества патологических ядер от интенсивности загрязнения окружающей среды и половых особенностей. Исследуемые структурно-функциональные изменения наследственного аппарата более выражены у людей, проживающих в экологически неблагоприятных условиях. Существенные нарушения регуляции функциональной активности генома обнаружены у мужчин из группы сравнения. Увеличение морфологически измененных ядер может служить индексом степени влияния факторов окружающей среды. Более высокий процент деструкции ядер у лиц из зоны с высокой техногенной нагрузкой по сравнению с таковыми у лиц из других экологических зон, может свидетельствовать о нестабильности наследственного аппарата, вызванной негативным экзогенным воздействием.

**Ключевые слова:** функциональное состояние генома, лимфоциты крови, долгожители

## ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL STATE OF LYMPHOCYTES' CHROMATIN IN THE POPULATION OF LONG LIVERS IN THE CARPATHIAN REGION

Kozoviy R.V.

*State Higher Educational Establishment «Ivano-Frankivsk National Medical University»,  
Ivano-Frankivsk, e-mail ruslan\_kozoviy@ukr.net*

A better understanding of the fundamental mechanisms of aging and longevity factors is crucial for the realization of the importance of the full potential of healthy aging. Particular attention acquire work's on study of the epigenetic mechanisms regulating the functioning of the genome. One of the convenient facilities for screening investigation of epigenetic regulating mechanisms of the genome functioning are neutrophilic granulocytes of peripheral blood. A comprehensive analysis of the three indicators interphase nuclei of peripheral blood lymphocytes (indexes of chromatization, nucleolar, morphologically altered nuclei) in 264 Long Livers (study group) and 218 persons of mature age (group) of three ecological zones Prykarpattya. Structural and functional changes in the hereditary apparatus more pronounced in people living in ecologically unfavorable conditions. Found that nucleolar index in the study group did not differ significantly from that of the comparison group, but he had a tendency to decrease in the long, rather than in those who lived in the same environmental conditions and had no hereditary predisposition to longevity. Most significant dysregulation of the functional activity of the genome found in men with comparison group. Increase of morphologically altered nuclei can serve as an index of the degree of influence of environmental factors. Analysis of the indexes functional condition of the genome indicates that the cause of his depression in people living in areas with high technological load imbalance is primarily in selected mechanisms involved in the implementation of genetic information at the cellular level.

**Keywords:** functional state of the genome, blood lymphocytes, Long Livers

В организме каждого человека в течение жизни координированно функционируют триллионы клеток, каждая из которых отличается дифференциальной экспрессией генов. Любой из последних может стать мишенью неблагоприятного влияния экзогенных факторов, что приводит к нарушениям реализации генетической информации [4]. Поэтому актуальным в условиях современной антропогенной нагрузки становится изучение особенностей функционирования активности генома. Особого внимания приобретают работы по изучению эпигенетических механизмов регуляции наследственной информации. Эпигенетика – наука, изучающая наследственные изменения

в фенотипе или в экспрессии генов, вызванные другими механизмами, кроме нарушения последовательности нуклеотидов ДНК [7]. Такие изменения могут оставаться видимыми в течение нескольких клеточных поколений или даже нескольких поколений живых организмов. Это осуществляется путем активации одних генов и ингибирования других. Эпигенетические механизмы контролируют многие биологические процессы, в частности, специфическую экспрессию генов, регуляцию структуры хроматина, репликацию ДНК, клеточное дифференцирование, геномный импринтинг, инактивацию X-хромосомы [5, 10]. Одним из удобных объектов для скрининг-

говых исследований эпигенетических механизмов регуляции функционирования генома являются лимфоциты периферической крови (ЛПК). Большинство исследований экспрессии генов в лимфоцитах основано на их стимуляции цитокинами и сфокусировано на ограниченном числе специфических генов, контролирующих синтез известных молекул. В то же время глобальное изучение ЛПК при этом часто выпадает из поля зрения исследователей. Установление особенностей функционального состояния генома (ФСГ) дает возможность объективно оценить активность генов ЛПК на разных этапах реализации наследственной информации [5]. У долгожителей подобные исследования не проводились. Лучшее понимание фундаментальных механизмов старения и факторов долголетия имеет первоочередную значимость для реализации полного потенциала здорового старения [1].

**Цель работы** – установление особенностей функционального состояния генома лимфоцитов периферической крови у долгожителей, проживающих в разных экологических зонах Прикарпатья.

**Материал и методы исследования**

Объектом исследования служили лимфоциты периферической крови долгожителей (основная группа) и людей зрелого возраста (группа сравнения). Распределение населения на экологические зоны проводилось на основе результатов предыдущих наших исследований, экологических паспортов области и отчетов экологических исследований [3, 6]. Среди долгожителей и лиц группы сравнения большинство было из населенных пунктов с умеренной экологической нагрузкой (табл. 1).

Группу сравнения составили лица в возрасте от 36 до 60 лет, в родословных которых не было долгожителей. Забор материала, изготовления препаратов с последующим окраской по Фельгену в модификации, которая позволяет провести дифференциальное окрашивание ДНК ядра и РНК ядрышек – основных компонентов клетки, осуществляли по соответствующей методике [2, 8].

Исследование изготовленных препаратов проводили на оптико-электронном комплексе «Метаскан-2». Индексы ФСГ изучали в 100 ядродержащих лимфоцитах каждого обследуемого. Индекс хроматизации (ИХ) устанавливали по отношению количества клеток, в ядрах которых преобладал эухроматин к количеству клеток, с преобладанием гетерохроматина. Ядрышковый индекс (ЯИ), индекс морфологически измененных ядер (МИЯ) – по процентам соответствующих клеток.

**Таблица 1**

Распределение исследуемого населения, проживающего в различных экологических зонах Прикарпатья

Исследуемые группы	Экологические зоны		
	Экологического благополучия, n = 137	Умеренной экологической нагрузки, n = 196	Неблагоприятная, n = 149
Основная, n = 264	75	107	82
Сравнительная, n = 218	62	89	67

**Результаты исследования и их обсуждение**

Сравнительный анализ ФСГ всех исследуемых людей позволил установить половые закономерности его индексов, а также их зависимость от воздействия комплекса факторов окружающей среды. Важнейшим маркером экспрессибельности генома является индекс конденсации хроматина, косвенно коррелирующий с количеством депрессированной ДНК [11]. У долгожителей установлено преимущество ядер с деконденсированным хроматином во всех экологических зонах по сравнению с таковыми в группе сравнения (табл. 2).

Деконденсация хроматина была существенней у мужчин, чем у женщин основной исследуемой группы. Показатель конденсации хроматина был меньше у долгожителей, проживающих в условиях экологического благополучия, по сравнению с таковыми в других зонах. Такая же тенденция наблюдалась и в группе сравнения.

Полученные данные могут указывать на отрицательное экзогенное влияние мутагенов на активность деспирализации ДНК.

На следующем этапе работы наше внимание было сосредоточено на механизмах, обеспечивающих трансляцию – синтез белковой молекулы. Показателем этого процесса является активность ядрышкового аппарата. В ядрышках осуществляется транскрипция генов, кодирующих рибосомные белки [7]. Количество ядрышек, их размеры и структура отображают метаболическую активность клеток или уровень дифференцировки и, соответственно, транскрипцию генов рибосомной РНК. Поскольку структурно-функциональные изменения ядрышек являются важным компонентом реакции клеток на стресс и вызывают их адаптацию к внешним воздействиям, ЯИ может быть объективным диагностическим маркером активности трансляционного аппарата. Установлено, что ЯИ превалировал у мужчин из сравнительной группы, которые проживали в зоне с умеренной эко-

гической нагрузкой (см. табл. 2). Следует отметить, что у всех исследуемых женщин, проживающих в зоне с неблагоприятными экологическими условиями, ЯИ достоверно был больше по сравнению с таковым у лиц из зоны экологического благополучия ( $p < 0,05$ ). У обследованных долгожителей ЯИ существенно не отличался от такового в группе сравнения. Однако он был незначительно меньше в основной группе, чем у лиц, проживавших в таких же экологических условиях и не имеющих наследственной предрасположенности к долголетию.

Изменения ИХ, ЯИ коррелировали с нарушениями нормальной структуры ядра (соответственно  $r = 0,79$ ;  $r = 0,86$ ;  $p < 0,05$ ). Это доказывает, что метаболизм клетки зависит от морфо-функциональных особенностей ядра. Для дифференциации вакуолизации ядер от состояния конденсации хроматина, при которой также образуются полости, которые разделяющие глыбки и тяжи хроматина, учтены рекомендации о том, что ядро при гетерохроматизации не набухает, а наоборот, сморщивается и хроматин становится темнее и плотнее (рисунок) [9].

Таблица 2

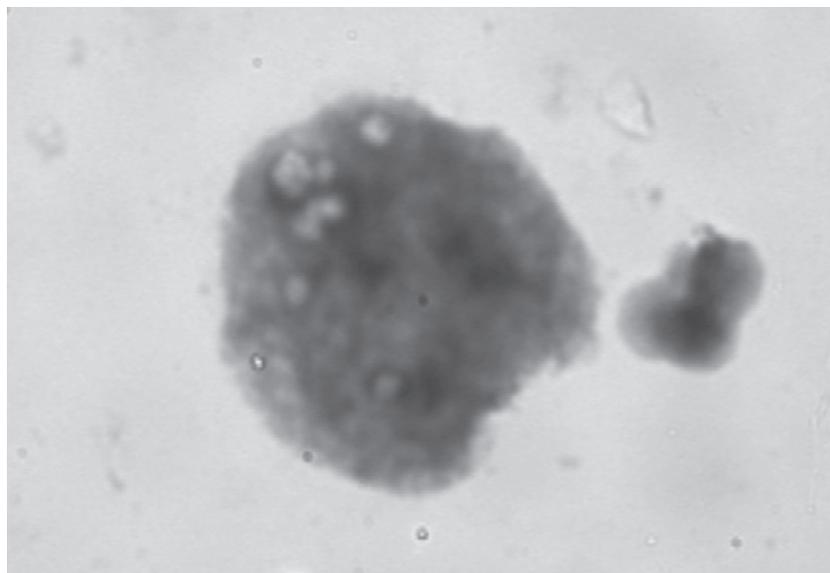
Цитологические показатели лимфоцитов периферической крови у долгожителей (А) и группы сравнения (В) с различных исследуемых районов Прикарпатья ( $M \pm m$ )

Экологическая зона	Пол	Индекс хроматизации, ум.од		Ядрышковый индекс, %		Морфологически измененные ядра, %	
		А	В	А	В	А	В
Экологического благополучия	женщины	0,71 ± 0,02	0,79 ± 0,04°	2,98 ± 0,51	3,21 ± 0,14	2,22 ± 0,33	2,56 ± 0,26
	мужчины	0,65 ± 0,02	0,72 ± 0,01°	4,08 ± 0,27	4,41 ± 0,22	2,46 ± 0,35	2,78 ± 0,48
Умеренной экологической нагрузки	женщины	0,80 ± 0,04*	0,82 ± 0,02	4,28 ± 0,28*	4,71 ± 0,31*	3,58 ± 0,32*	3,89 ± 0,67*
	мужчины	0,7,8 ± 0,02*	0,83 ± 0,051*	4,89 ± 0,44* °	6,29 ± 0,42*	3,31 ± 0,67	6,72 ± 0,51
Неблагоприятная	женщины	0,83 ± 0,03*	0,90 ± 0,04*	4,75 ± 0,32*	5,01 ± 0,31*	5,25 ± 0,34*	5,33 ± 0,41*
	мужчины	0,82 ± 0,02*	0,94 ± 0,03* °	5,14 ± 0,54*	5,85 ± 0,23*	5,42 ± 0,41*	6,44 ± 0,38*°

Примечания:

1\* – вероятность различий с показателями зоны экологического благополучия ( $p < 0,001$ );

2° – вероятность различий долгожителей с группой сравнения ( $p < 0,001$ ).



Морфологически измененное ядро в лимфоците периферической крови долгожителя В., проживающего в зоне с неблагоприятными экологическими условиями. Окраска по Фельгену. Ув.: об. 90 ок. 10

При сравнении МИЯ исследуемых людей из зоны с неблагоприятными экологическими условиями установлено его достоверное увеличение по сравнению с таковым у лиц, проживающих в условиях экологиче-

ского благополучия ( $p < 0,001$ ). Количество МИЯ была наибольшим у мужчин группы сравнения, проживающих в зоне умеренной экологической нагрузки, что взаимосвязано с увеличением в данной выборке ЯИ

( $r = 0,86$ ,  $p < 0,05$ ). Полученный результат требует более глубокого изучения. Количество МИЯ зависело также от пола – отмечено их незначительное превалирование у мужчин.

### Заключение

Анализ индексов ФСГ указывает на то, что причиной их угнетения у людей, проживающих на территориях с высокими техногенными нагрузками, может быть несбалансированность отдельных механизмов, участвующих в реализации наследственной информации на клеточном уровне.

### Список литературы

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.
2. Ганина К.П. Цитогенетическая диагностика в онко-морфологии. – Киев: Наукова думка, 1980. – 176 с.
3. Екологічний паспорт Івано-Франківської області (<http://www.menr.gov.ua/content/article/5982>).
4. Запорожан В. М. Генетичні передумови здоров'я нації // Журнал АМН України. – 2007. – Т. 13, № 3. – С. 455–463.
5. Кочерга З.Р. Діагностика затримки внутрішньоутробного розвитку плода за показниками функціонального стану нейтрофілних гранулоцитів периферійної крові новонароджених / З.Р. Кочерга, Л.Є. Ковальчук // Галицький лікарський вісник. – 2011. – Т.18, № 2. – С. 50–53.
6. Міністерство екології та природних ресурсів України. Інформаційно аналітичний центр Державної системи моніторингу довкілля. Розділ огляди, бюлетні і звіти стану довкілля <http://www.ecobank.org.ua/GovSystem/EnvironmentState/Reviews/Pages/default.aspx>.
7. Нейко Є.М. Епігенетичні механізми регуляції активності генів і мультифакторні хвороби / Є.М. Нейко, Л.Є. Ковальчук, Н.В. Чернюк // Галицький лікарський вісник. – 2007. – Т.14, № 1. – С. 11–14.
8. Рац. пропозиція 30/2319 Івано-Франківськ Виявлення ДНК в цитологічних препаратах / [Ковальчук Л.Є., Ковальчук Н.В., Ілік В.В.]; заявник і патентовласник. – Івано-Франк. держ. мед. ун-т, 1997.
9. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра каринологических показателей при оценке цитогенетического ста-

туса человека // Медицинская генетика. – 2007. – Т.6, № 11 (65). – С. 3–11.

10. Толмачова Е.Н. Инактивация X-хромосомы и патология человека / Е.Н. Толмачова, А.А. Кашеварова, И.Н. Лебедев // Медицинская генетика. – 2009. – № 7. – С. 9–15.

11. Newburger P.E. Global analysis of neutrofil gene expression / P.E. Newburger, Y.V. Subrahmanyam, S.M. Weissman // Cur. Opin. Haematol. – 2000 – Vol. 1, № 7. – P. 16–20.

### References

1. Anisimov V.N. *Molecular and physiological mechanisms of aging: Manual*. Nauka, 2003. 468 p.
2. Hanyna K.P. *Cytogenetic diagnostics in oncomorphology: Manual*. Scientific opinion, 1980. 176 p.
3. <http://www.menr.gov.ua/content/article/5982> (February 2013).
4. Zaporozhan V. *Journal of Medical Sciences of Ukraine*. 2007, Vol. 13, no. 3. pp. 455–463.
5. Kocherha Z.R., Kovalchuk L.E., *Halyskyi likarskyi visnyk*, 2011, Vol. 18, no. 2, pp. 50–53.
6. <http://www.ecobank.org.ua/GovSystem/EnvironmentState/Reviews/Pages/default.aspx> (February 2013).
7. Neiko E.M., Kovalchuk L.E., Chernyuk N.V. *Halyskyi likarskyi visnyk*, 2007, Vol. 14, no. 1, pp. 11–14.
8. Kovalchuk L.E., Kovalchuk N.V. Ilyk V.V., *Rats. Offer 30/2319 Ivano-Frankivsk Detection of DNA in cytological preparations*. 1997.
9. Sycheva L.P., *Medytsynskaya genetics*. 2007. Vol.6, no. 11 (65). pp. 3–11.
10. Tolmachev E.N., Kashevarova A.A., Lebedev I.N., *Medytsynskaya genetics*, 2009, no. 7, pp. 9–15.
11. Newburger P.E., Subrahmanyam Y.V., Weissman S.M., *Cur. Opin. Haematol*. 2000, Vol. 1, no. 7. pp. 16–20.

### Рецензенты:

Ковальчук Л.Е., д.м.н., профессор кафедры медицинской биологии и медицинской генетики, ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет», г. Ивано-Франковск;

Булык Р.Е., д.м.н., профессор кафедры медицинской биологии, генетики и фармацевтической ботаники Буковинского государственного медицинского университета, г. Черновцы.

Работа поступила в редакцию 18.06.2013.