

ISSN 1810-7834

ВІСНИК

УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ



TOM 4

2 · 2006

Редакційна колегія:

Шеф-редактор **М. В. РОЇК**
Головний редактор **В. А. КУНАХ**
Заступники головного редактора:
В. П. БУРКАТ, Л. Л. ЛУКАШ

І. Р. БАРИЛЯК
Я. Б. БЛЮМ
Н. Г. ГОРОВЕНКО
М. В. ЗУБЕЦЬ

Л. Є. КОВАЛЬЧУК
М. В. КУЧУК
С. С. МАЛЮТА
В. В. МОРГУН
В. Г. МИХАЙЛОВ

Л. А. НАЛЄСКИНА
Т. В. НОВАК
М. А. ПИЛІНСЬКА
Ю. М. СИВОЛАП
В. О. ФЕДОРЕНКО

Редакційна рада:

А. АТАНАСОВ (Болгарія)
Б. В. ДЗЮБЕЦЬКИЙ
В. А. ДРАГАВЦЕВ (Росія)
Н. А. КАРТЕЛЬ (Білорусь)
В. В. КИРИЧЕНКО
Г. І. ЛАЗЮК

Б. П. МАЦЕЛЮХ
М. Д. МЕЛЬНИЧУК
О. О. СОЗИНОВ
А. А. СИБІРНИЙ
Г. В. СКИБАН
А. Х. СТЕЛЬМАХ

В. П. ПАТИКА
В. М. ТОЦЬКИЙ
В. К. ШУМНИЙ (Росія)
Т. М. ЧЕЧЕНЄВА
Г. ФЕДАК (Канада)

Відповідальний секретар **О. О. ПОРОННИК**

Адреса редакції:

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Editorial board

Chief editor **M. V. ROIK**
editor-in-Chief **V. A. KUNAKH**
Deputy editors: **V. P. BURKAT, L. L. LUKASH**

I. P. BARYLYAK
Ya. B. BLUME
N. G. GOROVENKO
M.V. ZUBETS

L.Ye. KOVALCHUK
M. V. KUCHUK
S. S. MALYUTA
V. V. MORGUN
V. G. MYKHAILOV

I. A. NALESKINA
T. V. NOVAK
M. A. PYLINSKA
Yu. M. SIVOLAP
V. O. FEDORENKO

Editorial Council:

A. ATANASOV (Bulgaria)
B. V. DZYUBETSSKIY
V. A. DRAGAVTSEV (Russia)
N. A. KARTEL (Belarus)
V. V. KYRYCHENKO
G. B. LAZIUK (Belarus)

B. P. MATSELYUKH
M. D. MELNYCHUK
O. O. SOZINOV
A. A. SIBIRNIY
G. V. SKYBAN
A. F. STELMAKH

V. P. PATYKA
V. M. TOTSKIY
V. K. SHUMNY (Russia)
T. M. CHECHENEVA
G. FEDAK (Canada)

Responsible secretary **O. O. PORONNYK**

Editorial office address:
Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
150, Acad. Zabolotnogo str., Kyiv, 03143
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

ВІСНИК

УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ

ТОМ 4

№ 2

2006

The Bulletin of the Ukrainian Society for Genetics and Selections

ВИХОДИТЬ ДВІЧІ НА РІК • КИЇВ

ЗМІСТ

Оригінальні статті

- Горовенко Н. Г., Євсеєнкова О. Г., Зерова-Любимова Т. Е., Тищенко Н. О. Роль молекулярно-цитогенетичного методу в діагностиці синдрому Вільямса-Бойрена 143
- Недобою А. М., Ольхович Н. В., Пічкур Н. О., Горовенко Н. Г. Особливості молекулярно-генетичної діагностики хвороби Гоше 156
- Деміна Э. А. Чернобыльская катастрофа и проблемы малых доз радиации 164
- Грищенко Н. В., Соловійов О. О., Голомідов Д. О., Лівшиць Л. А. Дослідження мутантних варіантів гена Cx32 в родинах хворих з домінантним типом ШМТ в Україні 174
- Шкарупа В. М., Бариляк І. Р. Залежність концентрація — кластогенний ефект при дії мітоміцину С на клітини *Allium cepa* L. 181
- Безруков В. Ф., Верголяс М. Р., Манило Л. Г. Цитогенетические проявления нестабильности геномов у антарктических рыб 187
- Проценко О. В., Жук О. В., Козерецька І. А. Соотношение полов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины 193
- Янчук В. І., Мамалига В. С. Статистичний аналіз окремих морфо-біологічних ознак люцерни 200
- Твардовська М. О., Страшнюк Н. М., Мельник В. М., Адонін В. І., Кунах В. А. Мінливість числа хромосом та рівень хромосомних аберацій у культурі тканин тирличу безстеблового (*Gentiana acaulis* L.) 204

CONTENTS

Original Researches

- Gorovenko N., Ievseienkova O., Zerova-Lyubymova T., Tyshchenko N. Molecular-cytogenetic investigation in the diagnosis of Williams-Beuren syndrome 143
- Nedoboy A. M., Olkhovich N. V., Pichkur N. O., Gorovenko N. G. Peculiarities of the molecular genetics diagnostics of Gaucher disease 156
- Dyomina E. A. The chernobyl catastrophe and problems of low dose radiation 164
- Hryshchenko N. V., Solovyov O. O., Golomidov D. O., Livshits L. A. Cx32 mutation variants analysis in autosome dominant CMT-families in Ukraine 174
- Shkarupa V. M., Barylak I. R. Dependence concentration-effect at clastogenic activity mitomycin C in cells of *Allium cepa* L. 181
- Bezrukov V. F., Vergolyas M. R., Manilo L. G. Cytogenetic manifestations of genome instability of antarctic fishes 187
- Protsenco A. V., Zhuk O. V., Kozeretska I. A. *Wolbachia* sp. and sex ratio in natural populations of *Drosophila melanogaster* in Ukraine 193
- Yanchuk W. I., Mamalyga W. S. The statysic analysis of some morfobiological alfalfa peculiarities 200
- Twardovska M. O., Strashniuk N. M., Mel'nyk V. M., Adonin V. I., Kunakh V. A. Chromosome number variability and chromosome aberration level in *Gentiana acaulis* L. tissue culture 204

- Парнікоза І. Ю., Мірюта Н. Ю., Ал-Аммурі Ю., Адонін В. І., Кунах В. А. Особливості процесів проліферації та диференціації в культурі тканин раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. 210
- Парнікоза І. Ю., Мірюта Н. Ю., Ал-Аммурі Ю., Адонін В. І., Кунах В. А. The peculiarities of proliferation and differentiation processes in *Rauwolfia serpentina* Benth. tissue culture
- Лаврентьєва А. Н., Іванников Р. В. Мікророзмноження *Vanilla planifolia* G. Jackson (Orchidaceae Juss.) в умовах культури *in vitro* 217
- Лаврентьєва А. Н., Іванников Р. В. Micro-propagation of *Vanilla planifolia* G. Jackson (Orchidaceae Juss.) *in vitro*
- Карпова І. С., Корецька Н. В. Модулююча дія рослинних лектинів на мутагенний ефект іонів Ni(II) залежить від стану репаративної системи тест-об'єкта *Bacillus subtilis* 223
- Карпова І. С., Корецька Н. В. Modulating action of plant lectins on Ni(II) induced mutagenesis depends on repair system condition of the test-object *Bacillus subtilis*
- Лялько І. І., Дубровна О. В. Створення заплывача О-типу у кормових буряків за використання маркерної ознаки листового апарату 229
- Лялько І. І., Дубровна О. В. Creation of the pollinator O-type of fodder beet using marker sign of leaf's apparatus

Оглядові статті

- Рябченко Н. М., Дьоміна Е. А., Бариліак І. Р. Молекулярно-генетичні механізми формування радіочутливості людини 236
- Рябченко Н. М., Дьоміна Е. А., Бариліак І. Р. Molecular and genetic mechanisms of human radiosensitivity formation
- Шіліна Ю. В., Мамедлі С. А., Рашидов Н. М. Спонтанна і індукційована генетическая нестабільність соматических кліток растений 249
- Шіліна Ю. В., Мамедлі С. А., Рашидов Н. М. The spontaneous and induced genetic instability somatic plant cells
- Роїк М. В., Нурмухаммедов А. К., Васильєва Н. О. Ризоманія цукрових буряків та методи створення стійких селекційних матеріалів 271
- Роїк М. В., Нурмухаммедов А. К., Васильєва Н. О. Rhizomania of sugar beet and methods of development of resistant breeding materials

Рецензії

- Бурда Р. І. Рецензія на книгу "Академик Микола Іванович Вавилов: Полтавщина: Факти. Документи. Бібліографія" (укладачі Самородов В.М., Халимов О.В.) 283
- Бурда Р. І. Review for the book "Academician Mykola Ivanovych Vavilov: Poltava region: Facts. Documents. Bibliography" (Compilers Samorodov V.M., Khalymov O.V.)
- Малюта С. С. Рецензія на монографію В. А. Кунаха "Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи" 285
- Малюта С. С. Review of the monograph by V. A. Kunakh "Biotechnology of medicinal plants. Genetical and biochemical basis"

Особистості

- Кунах В. А., Тіток Т. Г. Професор П. О. Сітько — фундатор та учасник відродження генетики в Україні (до 100-ліття від дня народження) 287
- Кунах В. А., Тіток Т. Г. Professor P.O. Sit'ko — patriarch and participant of the genetics in Ukraine (to the centenary)
- Манзюк В. Т. Професор І. М. Поляков — видатний учений і історик біологічної науки 291
- Манзюк В. Т. Professor I. M. Polyakov — prominent scientist and historian of biology

Ювілеї

- В'ячеслав Григорович Михайлов (до 70-ліття від дня народження) 298
- Vyacheslav Grygorovych Mykhailov (to the 70th anniversary)

Некролог

- Олена Семенівна Алексєєва (1926–2006) 301
- Olena Semenivna Alekseeva (1926-2006)

Інформація

- Кунах В. А. III Міжнародна конференція "Агенти експериментальної еволюції організмів" 303
- Kunakh V. A. III International conference "Agents for experimental evolution of organisms"

УДК 575.191:616-056.7-076.5

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНОГО МЕТОДУ В ДІАГНОСТИЦІ СИНДРОМУ ВІЛЬЯМСА — БОЙРЕНА

Н. Г. ГОРОВЕНКО, О. Г. ЄВСЕЄНKOBA, Т. Е. ЗЕРОВА-ЛЮБИМОВА,
Н. О. ТИЩЕНКО

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика,
Україна, 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9,
e-mail: eflevs@mail.ru

Проведено комплексне обстеження пробандів з підозрою на синдром Вільямса — Бойрена із застосуванням клініко-генеалогічного, цитогенетичного (стандартного та високочутливого) та молекулярно-цитогенетичного (FISH) методів діагностики хромосомної патології. Показано провідну роль FISH-методу в діагностиці даного синдрому. Звертається увага на варіабельність прояву головних ознак синдрому які ускладнюють встановлення остаточного діагнозу та можуть призводити як до пізньої діагностики даного захворювання, так і до його гіпердіагностики. Підкреслюється необхідність лабораторного генетичного підтвердження попереднього клінічного діагнозу та наводяться результати власних досліджень, що були проведені в Україні вперше.

Ключові слова: Синдром Вільямса — Бойрена, синдроми сегментних анеусомій, цитогенетичний аналіз, FISH-діагностика.

Вступ. Синдром Вільямса — Бойрена (СВБ), OMIM 194050 — це мультисистемне захворювання, основні прояви якого спричинені втратою генів, розташованих в сегменті q11.23 довгого плеча хромосоми 7 [1]. Синдром було вперше описано Вільямсом із співавторами у 1961 р. серед групи дітей з надклапанним стенозом аорти, помірною розумовою затримкою та характерними дизморфіями обличчя, що створювали враження “обличчя ельфа”, а у 1962 р. Бойрен із співавторами доповнили спектр фенотипових ознак, описавши синдром у дітей зі стенозом легеневої артерії, аномаліями зубів та надмірною товариською поведінкою [2].

Частота синдрому у хлопчиків та дівчат однакова і складає 1 : 20 000 новонароджених [2]. У більшості випадків (95%) це спорадичне захворювання [3], але описані окремі випадки сегрегації в родині з передачею делетованої хромосоми від одного з батьків до дитини [1, 2, 4, 5]. Молекулярний аналіз показав, що делеція в хромосомі 7 може походити як від матері, так і від батька з рівною частотою, тому на сьогодні немає

© Н. Г. ГОРОВЕНКО, О. Г. ЄВСЕЄНKOBA, Т. Е. ЗЕРОВА-ЛЮБИМОВА, Н. О. ТИЩЕНКО, 2006

доказів переважного походження делеції від одного з батьків [1, 2]. В той же час, дослідники привертають увагу до ролі мікроінверсій, що виявляють в межах критичного для розвитку СВБ району хромосоми 7 у деяких батьків, як фактору, що збільшує ймовірність втрати хромосомного матеріалу або його перебудови у цій ділянці у їх дитини. Відкриття такого геномного поліморфізму у батьків дітей з СВБ та дітей з атипичним СВБ наближують дослідників до повного розкриття механізмів виникнення захворювання [7].

Синдром Вільямса — Бойрена має досить специфічну клінічну картину, що, здавалось, дає можливість лікарю-генетику встановлювати діагноз пацієнту за характерними клінічними ознаками. Однак значною перешкодою для встановлення заключного діагнозу під час клініко-генеалогічного аналізу є значна варіабельність прояву певних клінічних ознак, особливо у ранньому віці [7, 8]. Так, типові для СВБ риси (кучеряве волосся, широкий лоб, періорбітальна припухлість, зірчаста райдужка, плоске перенісся, кирпатий ніс, довгий фільтр, широкий рот, повні щокі та губи, дрібні зуби) [4, 9] з'являються лише через 4–5 місяців після народження та стають виразними на 3 — 4-му році життя [1, 10, 11]. Це значно ускладнює встановлення діагнозу у перші місяці та роки життя пацієнта, тому наслідком є пізня діагностика синдрому у віці, коли проведення медичних та педагогічних заходів реабілітації вже не може принести очікуваного ефекту. В той же час існує загроза гіпердіагностики синдрому, коли діагноз встановлюється хворому лише за окремими ознаками, що є характерними для СВБ, і пацієнт з іншою патологією багато років спостерігається та

лікується як хворий з хибним діагнозом СВБ [11]. Лабораторна верифікація попереднього клінічного діагнозу СВБ до останнього часу була доволі складною. Це пов'язано з тим, що до кінця минулого століття в генетичних лабораторіях застосовували переважно стандартні цитогенетичні методи діагностики хромосомної патології (аналіз хромосомних препаратів на метафазному рівні), які дозволяють виявляти не більше 12–20% випадків всієї хромосомної патології [12]. При використанні цього методу каріотип хворих з СВБ, в переважній більшості, встановлюється як нормальний, за виключенням випадків, коли має місце цитогенетично наявна делеція, або хромосома 7 приймає участь у структурних перебудовах з подальшою втратою хромосомного матеріалу довгого плеча у ділянці 7q11.23 [13].

Проблему підтвердження клінічного діагнозу СВБ стало можливим вирішити завдяки впровадженню в лабораторну практику високочутливих методів цитогенетичного аналізу (аналізу хромосомних препаратів на прометафазному рівні) [14] та інтенсивного розвитку молекулярно-цитогенетичних методів, а саме флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH-діагностики) [15]. В результаті застосування цих сучасних методів лабораторної діагностики було виявлено, що первинним дефектом, який призводить до розвитку синдрому Вільямса — Бойрена, є мікроделеція в локусі 7q11.23. Це дозволило включити дане захворювання до окремої групи синдромів, які супроводжуються мікроструктурними змінами хромосомного матеріалу, а саме синдромів сегментних анеусомій або мікроделеційних синдромів [14]. На сьогодні FISH є високоспецифічним та найбільш чут-

ливим сучасним методом діагностики, який дозволяє швидко та якісно визначити наявність чи відсутність мікрodelції в локусі 7q11.23 [16, 17, 18]. Завдяки цьому методу все більше захворювань та патологічних станів людини переміщуються з категорії невизначених, спорадичних хвороб до групи хромосомних та успадкованих [19].

Враховуючи клінічну варіабельність, яка ускладнює встановлення діагнозу СВБ, особливо на першому році життя пацієнтів, та необхідність наявності заключного діагнозу у хворих з підозрою на СВБ перед кардіохірургічним втручанням та при наданні хворому статусу інваліда за даним синдромом, застосування FISH-методу, як підтверджуючого лабораторного методу, є вирішальним для діагностики СВБ. **Метою** даної роботи була оцінка інформативності цитогенетичних (стандартних та високочутливих) і молекулярно-цитогенетичних методів дослідження (FISH-методу) для підтвердження клінічного діагнозу синдрому Вільямса — Бойрена та визначення етапності їх застосування.

Матеріали і методи

Дослідження проводилися у молекулярно-цитогенетичній лабораторії кафедри медичної генетики НМАПО ім. П. Л. Шулика. Об'єктом дослідження був 21 пацієнт з підозрою на синдром Вільямса — Бойрена з різних областей України. Серед обстежених було 10 осіб жіночої статі та 11 — чоловічої, вік на момент обстеження коливався від 3 міс. до 18 років. Всі пацієнти проходили декілька етапів дослідження.

Первинне генетичне обстеження пацієнтів проводилося за місцем проживання (або лікування) відповідно зі стандартною методикою, що відобра-

жена у методичних рекомендаціях [11]. При виявленні мінімальних діагностичних ознак, що є характерними для синдрому Вільямса — Бойрена, хворих направляли на кафедру медичної генетики для лабораторного підтвердження або спростування попередньо встановленого клінічного діагнозу.

На першому етапі дослідження нами було проведено клініко-генеалогічний аналіз пацієнтів, направлених на кафедру медичної генетики з підозрою на СВБ. Виходячи з результатів клінічного обстеження (відповідної кількості балів згідно з методичними рекомендаціями) були сформовані три групи пацієнтів з підозрою на СВБ: до групи I увійшли 7 пацієнтів з чітким клінічним діагнозом, до групи II увійшли 11 пацієнтів з сумнівним діагнозом. Третя група була сформована з 2 пацієнтів, які мали діагноз СВБ, що був встановлений багато років тому, але на момент направлення на кафедру медичної генетики був поставлений під сумнів та потребував спростування. До цієї ж групи III була включена пацієнтка з вродженою вадою серця, яка потребувала кардіохірургічного втручання. Вік дитини (3, 5 міс.) ускладнював виявлення достатньої кількості характерних для СВБ стигм, щоб включити її до групи I або II.

На другому етапі дослідження було проведено цитогенетичний аналіз хворих з підозрою на СВБ (21 пацієнт). Метою застосування стандартних та високочутливих цитогенетичних методів було виявлення цитогенетично наявної делеції ділянки q11.23 довгого плеча хромосоми 7 або виявлення участі даного критичного району хромосоми 7 в структурних перебудовах з іншими хромосомами.

Цитогенетичний аналіз був проведений із застосуванням стандартного напівмікрометоду отримання хромосом-

них препаратів (Hungerford, 1965). Отримання хромосом прометафазної конденсації (високочутливий метод діагностики) проводилося за стандартною методикою [21]. Після диференційного забарвлення GTG-методом хромосомні препарати аналізували за допомогою світлового мікроскопа ARISTOPLAN ("Leica") при збільшенні x1125.

На третьому етапі дослідження був застосований молекулярно-цитогенетичний (FISH) метод діагностики [21]. Дане дослідження було проведено для кожного з 21 пацієнта для підтвердження або спростування попереднього клінічного діагнозу та визначення ефективності застосування FISH-методу для діагностики СВБ в наших групах пацієнтів.

Для гібридизації використовували локус — специфічний зонд фірми "Vysis" (США) — LSI Williams Region (DNA Probe ELN, LIMK SO/D7S486.D7S522SG), який представляє собою суміш міченої флуорохромом Spectrum Orange проби, що маркує ділянку q11.23, яка включає гени ELN та LIMK 1 — для визначення наявності чи відсутності досліджуваної ділянки та пофарбованої флуорохромом Spectrum Green проби, яка маркує контрольну ділянку 7q31 в локусах D7S486 та D7S522 — для визначення присутності двох гомологів хромосоми 7 та місця їх розташування у про- або метафазній пластинці та в інтерфазному ядрі. Обробку препаратів проводили згідно із стандартним протоколом, рекомендованим фірмою-виробником та вперше впровадженим нами для роботи в Україні. Аналіз отриманих препаратів проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопу AxioPlan 2 ("Zeiss", Німеччина) з 100-ватною люмінесцентною лампою та набором спеціальних фільтрів (DAPI/FITC/Rhodamine, "Zeiss", Німеччина), які дають можливість одночасно візуалізувати три флуорохром.

Отримані результати цитогенетичних та молекулярно-цитогенетичних досліджень записували згідно з ISCN (2005).

Результати та обговорення

На першому етапі дослідження клініко-генеалогічний аналіз показав, що 7 пацієнтів, які увійшли до групи I, мали характерні для СВБ клінічні ознаки. 11 пацієнтів, що склали групу II, не мали повного спектра фенотипових ознак, однак більшість пацієнтів з цієї групи поєднувала наявність вади серця — надклапанного стенозу аорти, що притаманний для даного синдрому. У одного з пацієнтів цієї групи, окрім надклапанного стенозу аорти, не було виявлено характерних для СВБ клінічних ознак (пацієнт 17). Даний пацієнт потребував термінового спростування або підтвердження діагнозу для визначення тактики проведення кардіохірургічного втручання. До третьої групи увійшли 3 пробанди, з яких у одній пацієнтки (пацієнтка 18) діагноз СВБ було встановлено у 5-річному віці під час огляду дільничним педіатром на основі окремих клінічних ознак та наявності вади серця — дефекту міжшлункової перетинки. Дівчина мала статус інваліда за даним синдромом з 5 років. Однак під час огляду лікарем-генетиком через 12 років після встановлення діагнозу у дівчини не було виявлено характерних для СВБ клінічних ознак, ця пацієнтка потребувала спростування попередньо встановленого діагнозу СВБ. Друга пацієнтка мала певні риси СВБ та ваду серця — пролапс мітрального клапана та дефект міжпередсердної перетинки. Дитині на момент огляду було 3,5 міс., і вирішувалось питання про можливість кардіохірургічного втручання. У третьої пацієнтки з цієї групи було виявлено ваду серця — про-

лапс мітрального клапану (пацієнтка 11) та встановлено діагноз СВБ дільничим лікарем декілька років тому.

На другому етапі дослідження всім 21 пацієнтам було проведено каріотипування із застосуванням стандартних та високочутливих методів аналізу хромосомних препаратів. Результати клінічного та цитогенетичного методів дослідження заносили у відповідні протоколи досліджень.

На третьому етапі для всіх пацієнтів кожної групи було проведено молекулярно-цитогенетичне дослідження.

Результати комплексного обстеження із застосуванням клініко-генеалогічного, цитогенетичного (стандартного та високочутливого) та молекулярно-цитогенетичного методів дослідження наведені у табл. 1. Мінімальні діагностичні ознаки, що були виявлені в групах обстежуваних, представлені в табл. 2 та 3.

Таблиця 1. Результати комплексного обстеження пацієнтів з підозрою на синдром Вільямса — Бойрена

Пациент	Вид дослідження	Клініко-генеалогічний аналіз	Стандартний цитогенетичний аналіз	Високочутливий цитогенетичний аналіз	FISH-метод діагностики
Пациент 1	+	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 2	+	-	-	-	nuc ish 7q11.2(ELN×1,LIMK1×1)
Пациент 3	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 4	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 5	+/-	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 6	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 7	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 8	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 9	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 10	+	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 11	?	-	-	-	nuc ish 7q11.2(ELN×1,LIMK1×1)
Пациент 12	+	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 13	+	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 14	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 15	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 16	?	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish 7q11.2(ELN×2,LIMK1×2)
Пациент 17	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish 7q11.2(ELN×2,LIMK1×2)
Пациент 18	?	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish 7q11.2(ELN×2,LIMK1×2)
Пациент 19	+/-	+	46,XY	46,XY	46,XY.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 20	+	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)
Пациент 21	+/-	+	46,XX	46,XX	46,XX.ish del(7)(q11.2q11.2)(ELN-,LIMK1-)

+ — попередній клінічний діагноз — СВБ;

+/- — попередній клінічний діагноз СВБ під сумнівом;

? — попередній клінічний діагноз СВБ за окремими ознаками.

Таблиця 2. Клінічні ознаки, характерні для синдрому Вільямса — Бойрена, які були виявлені у обстежуваних пацієнтів у порівнянні з результатами молекулярно-цитогенетичного дослідження

Клінічні групи та результати FISH-аналізу	Попередній клінічний діагноз СВБ — група I		Попередній клінічний діагноз СВБ під сумнівом — група II		Попередній клінічний діагноз СВБ за окремими ознаками — група III	
	FISH +, n = 7	FISH -, n = 0	FISH +, n = 10	FISH -, n = 1	FISH +, n = 1	FISH -, n = 2
Характерні ознаки						
Типове "обличчя ельфа"	1	-	-	-	-	-
Зірчаста райдужка	-	-	3	-	-	-
Короткий ніс або відкриті ніздрі	6	-	6	-	1	2
Сплющений кінчик носа	6	-	2	-	-	-
Повні щоки	7	-	4	-	1	-
Повні губи	6	-	6	-	-	"бантиком"
Широкий рот	3	-	5	-	-	-
Довгий фільтр	5	-	5	-	-	короткий
Періорбітальна припухлість	6	-	2	-	-	-
Епікант	4	-	3	-	-	-
Бігемпоральне звуження	-	-	1	-	-	-
Мікродонтія	5	-	6	-	1	-
Мікрогнатія	7	-	3	-	-	1
Конвергентна косоокість	2	-	1	-	1	-
Грубий голос	4	-	3	-	1	-
Закрепи	2	-	3	-	-	-
Пахова кила	3	-	3	-	-	пупкова
Затримка фізичного розвитку	4	-	1	-	1	2
Затримка розвитку та розумова відсталість	5	-	1	-	1	-
Затримка мовного розвитку	5	-	5	-	-	1
Зорово-просторові порушення	-	-	1	-	1	-
Екстравертна поведінка	3	-	-	-	1	-
Тривожність	1	-	3	-	-	-

Згідно з міжнародними правилами [20], застосування стандартних та високочутливих цитогенетичних методів є обов'язковим першим етапом лабораторного дослідження при підозрі на наявність хромосомної патології. Це в

повній мірі стосується діагностики синдромів сегментних анеусомій та СВБ зокрема. В нашому дослідженні, як видно з результатів табл. 1, застосування стандартних (аналіз на рівні 200–400 сегментів на гаплоїдний набір) та

Таблиця 3. Серцево-судинна патологія, що була виявлена у пацієнтів з підозрою на синдром Вільямса — Бойрена у порівнянні з результатами молекулярно-цитогенетичного дослідження

Клінічні групи та результат FISH-аналізу	Попередній клінічний діагноз СВБ — група I		Попередній клінічний діагноз СВБ під сумнівом — група II		Попередній клінічний діагноз СВБ за окремими ознаками — група III	
	FISH +, n = 7	FISH -, n = 0	FISH +, n = 10	FISH -, n = 1	FISH +, n = 1	FISH -, n = 2
Серцево-судинні аномалії						
Надклапанний стеноз аорти	4	-	7	1	-	-
Надклапанний та підклапанний стеноз аорти	1	-	-	-	-	-
Підклапанний стеноз аорти	1	-	-	-	-	-
Периферичний стеноз легеневої артерії	1	-	-	-	-	-
Пролапс мітрального клапана	1	-	1	-	1	1
Артеріальна гіпертензія	-	-	-	-	-	1
Дефект міжпередсердної перетинки	-	-	-	-	-	1
Дефект міжшлункової перетинки	-	-	1	-	-	1
Звуження в устях правої підключичної та лівої сонної артерії	1	-	-	-	-	-
Стеноз гілок легеневої артерії	-	-	1	-	-	-

високочутливих (аналіз на рівні 550–850 сегментів на гаплоїдний набір) цитогенетичних методів діагностики в усіх трьох групах було малоінформативним. Дані результати були певним чином передбачувані, тому що велика, цитогенетично наявна, делеція визначається у незначного відсотка пацієнтів [4, 22, 23], в той час як у 90–95% пацієнтів виникнення характерних клінічних ознак пов'язане з мікроделецією сегмента q11.23 довгого плеча хромосо-

ми 7, яку можливо виявити лише при застосуванні більш чутливих методів [9, 10, 24]. Саме завдяки розвитку та впровадженню в лабораторну діагностику високочутливих цитогенетичних та молекулярно-цитогенетичних методів було визначено, що розвиток СВБ пов'язаний з мікроделецією сегмента q11.23 у довгому плечі хромосоми 7. Згідно з даними різних авторів протяжність делеції може варіювати у різних індивідуумів від 0,6 до 2 Mb [18,

25]. Численні дослідження показали, що мікрodelеція у довгому плечі хромосоми 7 (7q11.23) розміром ~1,5 Mb зачіпає розташовані у цій ділянці ген еластину ELN, ген LIM-кінази 1 (LIMK1) та 15–21 суміжних генів [25]. Критичний для розвитку СВБ район знаходиться у межах гена еластину. У більшості випадків незначні розміри хромосомної аберації пояснюють малу інформативність стандартних методів цитогенетичного аналізу, тому у цих пацієнтів при аналізі хромосом на рівні 450–550 сегментів на гаплоїдний набір каріотип відповідає нормі. В той же час, в літературі є декілька повідомлень про виявлення великої, видимої цитогенетично, делеції даної ділянки та участь сегмента q11.23 хромосоми 7 у хромосомних перебудовах [9, 13, 17, 26, 27].

Виходячи з того, що застосування цитогенетичних методів під час нашого дослідження було малоінформативним, наступним кроком верифікації діагнозу СВБ стало дослідження пацієнтів за допомогою молекулярно-цитогенетичного методу.

У нашому дослідженні FISH-аналіз був проведений всім пацієнтам з трьох груп. За допомогою FISH-методу діагностики всім 7 пацієнтам з групи I без винятку, які мали чітку клінічну картину, діагноз СВБ був підтверджений. Як видно з таблиць 2 та 3, у більшості пацієнтів з групи I були присутні мінімальні діагностичні ознаки, характерні для СВБ. Серед 11 пацієнтів з групи II з сумнівним клінічним діагнозом остаточний діагноз СВБ був підтверджений для 10-х пробандів, а в одному випадку застосування FISH-методу допомогло встановити точний діагноз для пацієнта 17, у якого не спостерігалось достатньої кількості мінімальних діагностичних ознак, характерних для дано-

го синдрому, проте у цього пацієнта було виявлено притаманну СВБ ваду серця — надклапанний стеноз аорти. За допомогою FISH-методу у цієї дитини попередній діагноз СВБ було спростовано та встановлено діагноз — ізольований надклапанний стеноз аорти, що було враховано при подальшому кардіохірургічному втручанні. Надклапанний стеноз аорти є одним з проявів еластинової артеріопатії, яка виникає внаслідок втрати гена еластину [28], і подібна вада серця зустрічається у 75% пацієнтів з СВБ [2]. Відомо, що для виникнення основних клінічних ознак синдрому необхідною умовою є делеція гена еластину та суміжних з ним генів, в той час як мутація лише в гені еластину призводить до виникнення ізольованого надклапанного стенозу аорти, що є окремим домінантним синдромом (OMIM 185500) [1, 2, 4, 9, 25, 27].

Завдяки застосуванню FISH-методу діагностики діагноз СВБ було спростовано і у двох дівчат з групи III. Одна з них — дівчина 18 років (пацієнтка 18), мала інвалідність за даним синдромом протягом багатьох років відповідно з встановленим у 5-річному віці діагнозом СВБ. Аналіз медичної картки хворої показав, що клінічний діагноз було встановлено на основі окремих стигм, характерних для СВБ. При обстеженні лікарем-генетиком у дівчини не було виявлено характерних клінічних ознак СВБ. Вада серця — дефект міжпередсердної перегородки, що був діагностований у цієї дівчини, також не є характерною для СВБ. Таким чином, пацієнтка 18 потребувала спростування попереднього клінічного діагнозу СВБ, відсутність якого і було підтверджено за допомогою молекулярно-цитогенетичного методу. Інша дівчинка з групи III з підозрою на СВБ була обстежена у

віці 3, 5 міс., коли більшість ознак ще не достатньо проявляються. Вона мала повні щоки та короткий ніс, в той час, як фільтр був короткий, що не є характерним для СВБ, та губи були не повні, а мали вигляд "бантика". Дівчинка мала нетипову для СВБ ваду серця — дефект міжшлуночкової перетинки. Попередній діагноз СВБ для даної дитини, яка мала направлення на генетичне дослідження від дільничного лікаря за місцем проживання, було спростовано. Описані два випадки встановлення діагнозу лише на основі окремих діагностичних ознак свідчать про можливість гіпердіагностики СВБ та підкреслюють необхідність проведення підтверджуючої генетичної лабораторної діагностики при підозрі на даний синдром. Третій пацієнт з групи III — дівчина 9 років, відповідно обстеженню за місцем проживання мала пролапс мітрального клапана та була направлена на кафедру медичної генетики НМАПО ім.П.Л.Шупика для уточнення діагнозу СВБ, тому що мала лише окремі стигми СВБ. В даному випадку було підтверджено попередній клініч-

ний діагноз. Таким чином, в зв'язку з тим, що клінічна картина синдрому Вільямса — Бойрена є специфічною, але варіабельною, ми вважаємо, що всі пацієнти з попереднім клінічним діагнозом СВБ потребують лабораторного підтвердження із застосуванням цитогенетичних та молекулярно-цитогенетичних методів діагностики.

Суттєвим вважаємо той факт, що у двох випадках (пацієнти 2 та 11) завдяки застосуванню FISH-методу попередній діагноз СВБ було підтверджено на інтерфазних ядрах. Необхідність аналізу інтерфазних ядер виникла внаслідок низького мітотичного індексу або відсутності метафазних пластинок в хромосомних препаратах пацієнтів у зв'язку з проведенням пацієнтами інтенсивного лікування антибіотиками на момент проведення цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного досліджень.

Підсумкові результати інформативності застосування лабораторних генетичних методів діагностики синдромів сегментних анеусомій на прикладі синдрому Вільямса — Бойрена наведені у табл. 4.

Таблиця 4. Підсумкова таблиця інформативності використання лабораторних методів дослідження для встановлення діагнозу синдрому Вільямса — Бойрена

Клінічний діагноз / Вид дослідження		Попередній клінічний діагноз СВБ (кількість пацієнтів, n = 7, група I)	Попередній клінічний діагноз СВБ під сумнівом (кількість пацієнтів, n = 11, група II)	Попередній клінічний діагноз СВБ за окремими ознаками (кількість пацієнтів, n = 3, група III)
Клініко-генеалогічний		7	11	3
Стандартний цитогенетичний аналіз		-	-	-
Високочутливий цитогенетичний аналіз		-	-	-
FISH-метод діагностики	Позитивний(+)	7	10	1
	Негативний(-)	-	1	2

З табл. 4 видно, що найбільш інформативним у діагностиці СВБ під час нашого дослідження був молекулярно-цитогенетичний метод, який дозволив швидко та якісно підтвердити або виключити попередній діагноз СВБ серед обстежуваних пацієнтів з трьох груп. FISH-метод діагностики є на сьогодні найбільш сучасним та високоспецифічним методом, який успішно застосовується для виявлення та ідентифікації як кількісної, так і структурної хромосомної патології. Перевага FISH-методу діагностики полягає у можливості проведення ідентифікації мікрodelеції не тільки на про- та метафазних препаратах, а і на інтерфазних ядрах. Використання локус-специфічних зондів підвищує чутливість та інформативність методу у порівнянні зі стандартними та високочутливими цитогенетичними методами та дозволяє з високою точністю підтвердити або виключити попередній клінічний діагноз. Особливої актуальності така діагностика набуває при встановленні діагнозу СВБ на першому році життя пацієнта, коли ще не відбулася маніфестація всіх характерних клінічних ознак [22]. Своєчасна діагностика та адекватна тактика ведення хворих з синдромом Вільямса — Бойрена дає можливість істотно знизити рівень дитячої смертності під час кардіохірургічного втручання в цій групі пацієнтів [11] та у дорослому віці [22, 28]. Раннє виявлення та підтвердження синдрому Вільямса — Бойрена також є дуже важливим для психопедагогічної корекції, яка дозволяє суттєво покращити соціальну адаптацію пацієнта в суспільстві. Підтвердження або спростування попереднього клінічного діагнозу дає можливість правильно та якісно визначати прогноз

і тактику ведення хворого, проводити повноцінне медико-генетичне консультування в родині [11].

Висновки

1. Застосування FISH-методу діагностики хромосомної патології дозволило вперше в Україні підтвердити клінічний діагноз синдрому Вільямса — Бойрена для 18 пацієнтів та спростувати такий діагноз для 3 пацієнтів.

2. Лабораторна діагностика синдрому Вільямса — Бойрена повинна включати наступні етапи:

— стандартний (на рівні метафазних хромосом) цитогенетичний аналіз;

— високочутливий (на рівні прометафазних хромосом) цитогенетичний аналіз;

— молекулярно-цитогенетичний аналіз (FISH-метод). При низькому мітотичному індексі та відсутності метафазних/прометафазних пластинок на хромосомних препаратах інформативним є застосування FISH-методу на інтерфазних ядрах.

3. FISH-метод діагностики слід проводити всім дітям раннього віку з надклапанним стенозом аорти або периферійним стенозом легеневої артерії, незважаючи на відсутність мінімальних діагностичних ознак, що є характерними для синдрому Вільямса — Бойрена.

4. При встановленні клінічного діагнозу синдрому Вільямса — Бойрена у будь-якому віці діагноз повинен бути підтверджений FISH-методом діагностики.

Робота виконана за рахунок гранту з Інститутом медичної генетики, Цюріх (№ 7 IP 62652, 7 IP 051778) та гранту Президента України для обдарованої молоді (№ 29, 2004 р.).

Автори висловлюють подяку лікарям — генетикам Михайлець Л.П., Шейко Л.П., Пічкур Н.О., Циганковій М.А.

Перелік літератури

1. Morris Colleen A., Mervis Carolyn B. Williams Syndrome and Related Disorders // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*— 2000.— 1.— P. 461–484.
2. Donnai D., Karmill S.A. Williams Syndrome: From Genotype Through to the Cognitive Phenotype // *Am. J. Med. Genet. (Semin. Med. Genet.)*.— 2000.— 97.— P. 164–171.
3. Bayes M., Magano L. F., Rivera N., Flores R., Perez Jurado L. A. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. // *Am. J. Hum. Genet.*— 2003.— 73.— P. 131–151.
4. Wu Y.-Q., Nickerson E., Shaffer L.G., Keppler-Noreuil K., Mullenburg A. A case of Williams syndrome with a large, visible cytogenetic deletion // *J. Med. Genet.*— 1999.— 36.— P. 928–932.
5. Pankau R., Siebert R., Kautza M., Schneppenheim R., Gosch A., Wessel A., Partsch C.-J. Familial Williams-Beuren Syndrome Showing Varying Clinical Expression // *American Journal of Medical Genetics* — 2001.— 98.— P. 324–329.
6. Schere S. W., Gripp K. W., Nicholson J. L. L., Bonnefont J.-P., Perez-Jurado L. A., Osborne L.R. Observation of a parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children // *Hum. Genet.*— 2005.— 117.— P. 383–388.
7. Amenta S., Sofoclobous C., Kollallexi A., Thomaidis L., Giouroukos S., Karavitakis E., Mavrou A., Krrsiou S., Kanavakis E., Fryssira H. Clinical manifestations and molecular investigation of 50 patients with Williams syndrome in the Greek population // *Pediatric research*.— 2005.— 57 (6).— P.789–795.
8. Von Beust G., Laccone F. A., Del Pilar Andrino M., Wessel A. Clinical aspects and genetics of Williams— Beuren syndrome. Clinical and molecular genetic study of 44 patients with suspected Williams— Beuren syndrome // *Klin. Pediatr.*— 2000.— 212 (6).— P. 299–307.
9. Von Dadelszen P., Chitayat D., Winsor E. J., Cohen H. MacDonald C., Taylor G., Rose T., Hornberger L. K. De novo 46, XX, t(6;7)(q27;q11;23) associated with severe cardiovascular manifestations characteristic of supravalvular aortic stenosis and Williams syndrome // *Am. J. Med. Genet.*— 2000.— 90(4).— P. 270–275.
10. Mizunho S., Sugayama, M., Moises R. L., Wagenfur J., Ikari N. M., Terada Abe K., Leone C., Da Silva C. A. A., De Lourdes M., Chauffaille L. F., Kim C. A. Williams-Beuren syndrome. Cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization // *Arg. Bras. Cardiol.*— 2003.— 81 (5).— P. 468–473.
11. Горovenко Н. Г., Зерова-Любимова Т. Е., Тищенко Н. О., Євсеєнкова О. Г. Синдром Вільямса: клініка, особливості лікування, медико-генетичне консультування // *Методичні рекомендації*.— К.— 2005.— 20с.
12. Кулешов Н. П. Клиническая цитогенетика в Российской Федерации // *Материалы научно-практической конференции “Современные методы диагностики наследственных болезней”* — Москва.— 2001.— С. 30–37.
13. Прокофьева А. Д., Томилин Н. В., Прозорова М. В., Бутомо И. В., Василькова И. В., Ледащева Т. А., Максимова С. П., Пантова И. Г., Хитрикова Л. Е. Молекулярно-цитогенетическое исследование при синдроме Вильямса у детей из Санкт-Петербурга // *Медицинская генетика*.— 2003.— 2, №11.— С. 469–473.
14. Залетаев Д. В. Молекулярно-генетическая диагностика в клинической цитогенетике // *Материалы научно-практической конференции “Современные методы диагностики наследственных болезней”*.— М.— 2001.— С. 60–67
15. Ворсанова С. Г., Юров Ю. Б., Чернышов В. Н. Хромосомные синдромы и аномалии. Классификация и номенклатура // *Ростов-на-Дону*.— 1999.— 192 с.
16. Von Beust G., Laccone F. A., Del Pilar Andrino M., Wessel A. Clinical aspects and genetics of Williams-Beuren syndrome. Clinical and molecular genetic study of 44 patients with suspected Williams-Beuren

- syndrome // *Klin. Padiatr.*— 2000.— 212(6).— P. 299-307.
17. Hou J. W., Wang J. K., Wang T. R. Microdeletion of chromosomal region 7q11.23 in Williams syndrome // *J. Formos. Med. Assoc.*— 1997.— 96(2).— P. 137-140.
18. Francke U. Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms // *Human Molecular Genetics.*— 1999.— 8 (10).— P. 1947-1954.
19. Бужівська Т. І. Основи медичної генетики // К.: Здоров'я, 2001.— 135 с.
20. Зерова-Любимова Т. Е., Горovenko Н. Г. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини // *Методичні рекомендації.*— К.— 2003.— 24 с.
21. Евсеенкова О. Г., Зерова-Любимова Т. Н., Смутьська Н. Є., Горovenko Н. Г. Сучасні підходи в лабораторній діагностиці синдромів сегментних анеусомій на прикладі синдрому Прадера-Віллі // *Збірник наукових праць співробітників КМАПО ім. П. Л. Шупика* — К.— 2004.— С. 115-124.
22. Eronen M., Peippo M., Hiippala A., Raatikka M., Arvio M., Johansson R., Kahkonen M. Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome // *J. Med. Genet.*— 2002.— 39.— P. 554-558.
23. Hou J.W., Wang J.K., Wang T.R. FISH analysis in both classical and atypical cases of Williams-Beuren syndrome // *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi.*— 1998.— 39(6).— P. 398-403.
24. Morimoto M., An B., Ogami A., Shin N., Sugino Y., Sawai Y., Usuku T., Tanaka M., Hirai K., Nishimura A., Hasegawa K., Sugimoto T. Infantile spasms in a patient with williams syndrome and craniosynostosis // *Epilepsia* — 2003.— 44(11).— P. 1459-1462.
25. Heller R., Rauch A., Luttgen S., Schroder B., Winterpacht A. Partial deletion of the critical 1.5 Mb interval in Williams-Beuren syndrome // *J. Med. Genet.*— 2003.— 40.— P. 1-5.
26. Joyce C. A., Zorich B., Pike S. J., Barber J. C., Dennis N. R. Williams-Beuren syndrome: phenotypic variability and deletions of chromosomes 7, 11, and 22 in a series of 52 patients. // *J. Med. Genet.*— 1996.— 33(12).— P. 986-992.
27. Duba H. C., Doll A., Neyer M., Erdel M., Mann C., Hammerer I., Utermann G., Grzeschik K. H. 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 // *Eur. J. Hum. Genet.*— 2002.— 10(6).— P. 351-361.
28. Imashuku S., Hayashi S., Kuriyama K., Hibi S., Tabata Y., Todo S. Sudden death of a 21-year-old female with Williams syndrome showing rare complications // *Pediatrics International.*— 2000.— 42.— P. 322-324.

Представлено Л. Л. Лукаш
Надійшла 12.10.2006

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА В ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМА ВИЛЬЯМСА — БОЙРЕНА

Н. Г. Горovenko, Е. Г. Евсеенкова,
Т. Э. Зерова-Любимова, Н. А. Тищенко

Национальная медицинская академия
последипломного образования
им. П. Л. Шупика МОЗ Украины,
Украина, 04112, г. Киев,
ул. Дорогожицкая, 9,
e-mail: elevs@mail.ru

Проведено комплексное обследование пробандов с подозрением на синдром Вильямса — Бойрена с использованием клинико-генеалогического, цитогенетического (стандартного и высокочувствительного) и молекулярно-цитогенетического (FISH) методов диагностики хромосомной патологии. Показана ведущая роль FISH-метода в диагностике данного синдрома. Обращается внимание на вариабельность проявления главных признаков синдрома, которые усложняют установление окончательного диагноза и могут приводить как к поздней диагностике данного заболевания, так и к его гипердиагностике. Подчеркивается необходимость лабораторного генетического подтверждения предварительного клинического диагноза синдрома Вильямса — Бойрена и приводятся ре-

зультаты собственных исследований, которые были проведены в Украине впервые.

Ключевые слова: Синдром Вильямса — Бойрена, синдромы сегментных анеусомий, цитогенетический анализ, FISH-диагностика.

MOLECULAR-CYTOGENETIC INVESTIGATION IN THE DIAGNOSIS OF WILLIAMS — BEUREN SYNDROME

*N. Gorovenko, O. Ievseienkova,
T. Zerova-Lyubymova, N. Tyshchenko*

National medical academy of post-graduate education named after P. L. Shupik.
Ukraine, 04112, Kyiv, Dorogozhitska st. 9,
e-mail: elevs@mail.ru

We performed complex investigation of the patients with the suspected Williams — Beuren syndrome (WBS). The clinical protocol included genealogical, cytogenetic (standard and high-resolution) and molecular-cytogenetic (FISH) methods. FISH analysis has been shown to have a main role in the diagnosis of WBS. Variable phenotype of the syndrome might cause the late diagnosis, as well as hyperdiagnostic approach. Consequently, the molecular-cytogenetic confirmation is needed in any case of clinical diagnosis of WBS. We present results of the first complex research of WBS patients performed in Ukraine.

Keywords: Williams — Beuren syndrome, segmental aneusomy syndrome, cytogenetic analysis, FISH-analysis.

УДК 616-056.7-053.2-07

ОСОБЛИВОСТІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБИ ГОШЕ

А. М. НЕДОБОЙ¹, Н. В. ОЛЬХОВИЧ¹, Н. О. ПІЧКУР², Н. Г. ГОРОВЕНКО²

¹ Українська дитяча спеціалізована лікарня "ОХМАТДИТ", Україна, 01135, Київ, вул. Чорновола 28/1, факс (044) 236-61-65, тел. (044) 236-69-42

² Кафедра медичної генетики НМАПО ім. П. Л. Шупика, Україна, 04112, Київ, вул. Дорогожицька, 9, тел. (044) 205-90-27, 205-48-13

Систематизовані дані мажорних мутацій в гені GBA на прикладі 8 європейських країн. Досліджено групу з 27 пацієнтів (26 родин) з ХГ в Україні на наявність мажорних мутацій (N370S, L444P та 84GG). Сумарна частка мажорних мутацій гена GBA в українських пацієнтів з ХГ (57,7%) дещо нижча за середню по Європі (65,1%), хоча найчастіша мутація N370S склала 42,3%, що мало відрізняється від європейської 40,5%. Проаналізовано генотип-фенотипові кореляції у пацієнтів з ХГ.

Ключові слова: Хвороба Гоше, мажорні мутації, європейські популяції, діагностичні методи, генотип-фенотип кореляції.

Вступ. Профілактика спадкових захворювань обміну речовин базується, перш за все, на розробці простих та ефективних методів молекулярної діагностики відповідних мутацій з метою виявлення максимально можливої кількості родин з підвищеним ризиком народження хворої дитини [1]. Чільне місце серед таких захворювань займає група лізосомних хвороб накопичення — спадкових порушень обміну речовин, які обумовлені переважно дефектами генів, що контролюють синтез лізосомних гідролаз і супроводжуються накопиченням нерозщепленого субстрату в клітинах організму.

Хвороба Гоше (ХГ) відноситься до лізосомних хвороб накопичення з аутосомно-рецесивним типом успадкування і обумовлена мутаціями в гені глюкоцереброзидази (GBA) [2]. Дефіцит глюкоцереброзидазної активності, який виникає внаслідок цих мутацій, призводить до накопичення нерозщепленого глікозилцераміду в лізосомах клітин, що спричиняє порушення функції макрофагів. В результаті виникає полісистемне захворювання, основними клінічними ознаками якого є гепатоспле-

© А. М. НЕДОБОЙ, Н. В. ОЛЬХОВИЧ, Н. О. ПІЧКУР, Н. Г. ГОРОВЕНКО, 2006

номегалія, панцитопенія та ураження кісткової тканини [3].

Ген *GBA* локалізований на довгому плечі хромосоми 1 у положенні q21 і має довжину 7kb. Він налічує 11 екзонів та 10 інтронів, довжина кДНК — 2,5 kb [4]. Характерною особливістю є існування окрім функціонального гена ще й псевдогена (*psGBA*), який проявляє високий рівень гомології (до 96% ідентичності). Псевдоген розташований на відстані 16 kb від функціонального гена та має довжину 5 kb [5]. Деякі мутації функціонального гена *GBA*, які є причиною виникнення ХГ, присутні також і в псевдогені, що сприяє генній конверсії та рекомбінації між функціональним геном та псевдогеном. Це вказує на фундаментальну роль псевдогена в утворенні мутацій в гені *GBA* [6].

Частота різних мутацій гена *GBA* в Україні не вивчалась, тому метою нашої роботи було визначення частоти та спектра мутацій в гені *GBA* у пацієнтів з ХГ з України та вивчення особливостей цих характеристик у порівнянні з даними про інші популяції.

Матеріали і методи

Досліджували зразки крові 27 пацієнтів з ХГ із 26 родин з різних регіонів України. В одній родині було обстежено два хворих сібси. ДНК виділяли з цільної гепаринізованої крові з використанням комерційного набору "ДНК — сорб — В" (ЦНДІ епідеміології МОЗ РФ). Якість препаратів ДНК оцінювалась методом перевірки співвідношення оптичної щільності при 260 та 280 нм на спектрофотометрі Specord-40 (Analytik Jena AG). Препарати ДНК зберігали при температурі +4 °С.

В зв'язку з існуванням високогомологічного псевдогена, молекулярно-генетичне дослідження проводили за методом "гніздової" ПЛР [7]. На першому етапі проводили ампліфікацію великої ділянки функціонального гена *GBA*, яка відповідає послідовності 8–11 екзонів. Для ампліфікації функціонального гена *GBA* використовували такі олігонуклеотидні праймери: праймер А: 5'ACCACCTAGAGGGGAAAGTG3', праймер В: 5'TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG 3'[8]. ПЛР проводили в об'ємі 50мкл при стандартних умовах за допомогою автоматичного ампліфікатора Perkin Elmer (США) з використанням "гарячого" старту.

На другому етапі, використовуючи отриманий фрагмент як матрицю, ампліфікували ділянки для детекції мутацій N370S (праймери 370F:5' CCTTTGTCTCTACCCTCGA 3', 370R:5' GACAAGTTACGCACCCAATT 3'), L444P (праймери 444F:5' CAATTGGGTGCGTAACTTTGT 3', 444R:5' TGCCCTCACCGGTTTAGC 3') та 84GG (праймери 84F:5' GGAATGTCCCAAGCCTTTGA 3', 84R:5' CACTGCCTGAAGTAGAAG 3').

Для ідентифікації цих мутацій використовували метод рестрикційного аналізу, який проводили за стандартним методом з використанням ендонуклеаз рестрикції: Xho1, Msp1, Bsa B1 (MBI Fermentas).

Аналіз продукту першого етапу „гніздової“ ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, а продуктів рестрикційного аналізу — методом електрофорезу в 8% та 20% поліакриламідному гелі.

Візуалізацію та реєстрацію результатів електрофорезу проводили за допомогою ультрафіолетового транслюмінатора та відеосистеми з комп'ютер-

ною програмою аналізу зображення "Біотест-А" (Біоком, Росія).

Мутації P178S, W184R та RecNcil були виявлені у поодиноких випадках в лабораторії молекулярної діагностики Дитячого госпіталю та регіонально-го медичного центру в Сіетлі, США.

Результати та обговорення

Перший етап досліджень вимагав систематизації даних про відомі на сьогодні мутації у гені *GBA*, описані в інших популяціях. Для цього ми ознайомились з найбільшим на сьогодні ресурсом баз даних відомих мутацій в генах, що визначають розвиток найбільш поширених спадкових захворювань людини (www.hgmd.org) та іншими інформаційними ресурсами [9].

На сьогодні вже описано близько 200 мутацій в гені *GBA* [8, 11]. Серед них — одонуклеотидні заміни (місенс-та нонсенс-мутації), інсерції, делеції, дуплікації, сплайсингові мутації, комбіновані мутації та рекомбінації в межах локусу. Мутації знайдено в усіх екзонах гена *GBA*. Найбільша кількість мутацій розташована в 5–10 екзонах. При дослідженнях було виявлено, що амінокислотні послідовності, які відповідають цим екзонам, відповідні за протеклітичну стабільність (5–6 та 9–10 екзони) та каталітичну активність фермента (8–11 екзони). Найчастішими вважаються мутації N370S, L444P, 84GG, D409H, IVS2+1, R496H [10] з розподілом сумарної частки таких мутантних алелів близько 96% у популяції євреїв ашкеназі та близько 75% для нееврейських популяцій [11]. В різних популяціях спектр мажорних мутацій варіює. У пацієнтів, які не мають єврей-

ського походження, близько 70% мутантних алелів становлять три мутації N370S, L444P та 84GG [12].

Аналіз результатів, проведених на час написання роботи популяційних досліджень, показав певні етнічні розбіжності в частоті та спектрі мажорних мутацій. Так, частота найбільш поширених мутацій N370S, L444P та 84GG в гені *GBA* в різних країнах Європи мало чим відрізняється (табл. 1), тоді як в Японії не знайдено жодного алеля з мутаціями N370S та 84GG [13]. Характерним є дуже висока частка вказаних мутантних алелів серед пацієнтів з ХГ єврейського походження. Більше того, з наведених (у табл. 1) даних видно, що мутація 84GG в нееврейських популяціях практично не зустрічається, тоді як серед євреїв ашкеназі вона складає 13%, тобто її можна вважати панетнічною [14].

За результатами проведеного нами молекулярного обстеження пацієнтів з ХГ з України (табл. 1) було встановлено, що частка алелів, які несуть мутацію N370S, була найбільшою і склала 22/52 (42,3%). Чотири пацієнти були гомозиготами по цьому алелю, а 14 пацієнтів — гетерозиготами і мали в другому алелі іншу мутацію. У восьми пацієнтів не було виявлено жодного алеля з мутацією N370S.

Частка алелів, які несуть мутацію L444P у обстежених нами пацієнтів з ХГ склала 8/52 (15,4%), але не було знайдено жодного пацієнта гомоалельного за мутацією L444P. Компаундних гетерозигот серед наших пацієнтів було 8 осіб, 6 з них мали генотип N370S/L444P. В українських пацієнтів не знайдено жодного алеля, який містив би мутацію 84GG.

Таким чином, частота та спектр мутацій, що спричинили хворобу Гоше у

Таблиця 1. Частота мутацій N370S, L444P та 84GG в гені GBA в різних популяціях

Країна (популяція)	Загальна кількість алелів	Частота мутантних алелів (%)			Сумарна частота, %	Джерело інформації
		N370S	L444P	84GG		
Європейський регіон						
Великобританія	54	26	35	2	63	Walley A., 1993
Росія	110	45,6	20	0	65,6	Букина Т. 2005
Чехія та Словаччина	58	48,3	19	0	67,3	Hodanova K., 1999
Польща	68	26	37	2	65	Tylki-Szymanska A., 1996
Україна	52	42,3	15,4	0	57,7	Власні дослідження
Румунія	40	50	22,2	0	72,2	Drugan C., 2002
Італія	288	36	27,4	0	63,4	Filocamo M., 2002
Іспанія	102	55	15	0	70	Alfonso P, 2001
Туреччина	34	35,3	26,5	-	61,8	Gurakan F., 1999
В середньому по Європі		40,5	24,2	0,4	65,1	
Інші регіони						
Аргентина	62	46,7	6,5	3,2	56,4	Cormand B., 1998
Японія	41	0	44	0	44	Ida H., 1998
Євреї ашкеназі	200	77	3	13	93	Germain D., 2004

українських пацієнтів, відповідає середньоєвропейській для осіб нееврейського походження.

На сьогоднішній день специфічна біохімічна діагностика у сукупності з клінічними і параклінічними даними вважається найбільш ефективним і точним методом встановлення діагнозу ХГ. Але молекулярно-генетичні дослідження також відіграють велику роль у діагностичному процесі і медико-генетичному консультуванні обтяжених сімей. Частоти та спектр розподілу мутацій в різних популяціях залежать від багатьох факторів, основними з яких є темпи мутагенезу та тиск природного відбору. Значний вплив на цей процес демонструють також такі особливості популяцій, як розміри, ступінь географічної та

етнічної ізольованості, величина імбридінгу, характер міграції населення.

Найважливішою характеристикою мутантного алеля є його кореляція з важкістю перебігу захворювання, тобто фенотиповий прояв мутації в гомозиготному стані, а також в компаунді з іншими мутантними алелями того ж гена. Слід зазначити, що генотип-фенотипові кореляції ХГ не є абсолютними. Значне перекривання клінічних проявів знайдено у пацієнтів з різними генотипами і навпаки. Однак все ж описані деякі характерні закономірності, які в значній мірі полегшують медико-генетичне консультування та прогноз в сім'ях, обтяжених ХГ.

Мутація N370S знаходиться в 9 екзоні гена GBA та викликана заміною А

на G в позиції 1226 кДНК гена GBA і призводить до синтезу ферменту з незначними структурними перебудовами, що забезпечує певний рівень залишкової активності [15]. Тому присутність цієї мутації є полегшуючим фактором у розвитку хвороби. У пацієнтів, які мають хоча б один алель з N370S, не розвиваються первинні неврологічні порушення. Пацієнти, які є гомозиготами за N370S, мають тенденцію до легкого перебігу хвороби у порівнянні зі складними гетерозиготами. Встановлено, що значна частка євреїв ашкеназі з таким генотипом може взагалі бути асимптоматичними.

Мутація L444P замінює лейцин, розташований у каталітичному домені глюкоцереброзидази, що призводить до нестабільності ферменту і, як результат, дуже низької залишковою активності або, взагалі, повної її відсутності [8]. Це пояснює тенденцію до появи ускладнень у перебігу захворювання або неврологічних проявів у хворих з мутацією L444P. Пацієнти гомозиготні за L444P мають тенденцію до більш тяжкого перебігу хвороби та часто з неврологічними ускладненнями (II та III типи). Хоча описані випадки як у дітей, так і у дорослих, які не мали вираженої неврологічної симптоматики.

За даними досліджень не ідентифіковано жодного живонародженого пацієнта, який би був гомозиготою за мутацією 84GG. Тому вважається, що цей генотип не сумісний з життям [3].

Переважає більшість обстежених нами пацієнтів мала І неейронопатичний тип захворювання (24 особи). Аналіз спектра мутацій в гені GBA, виявлених у цих пацієнтів, (діаграма 1) показує, що, як і очікувалось, найчасті-

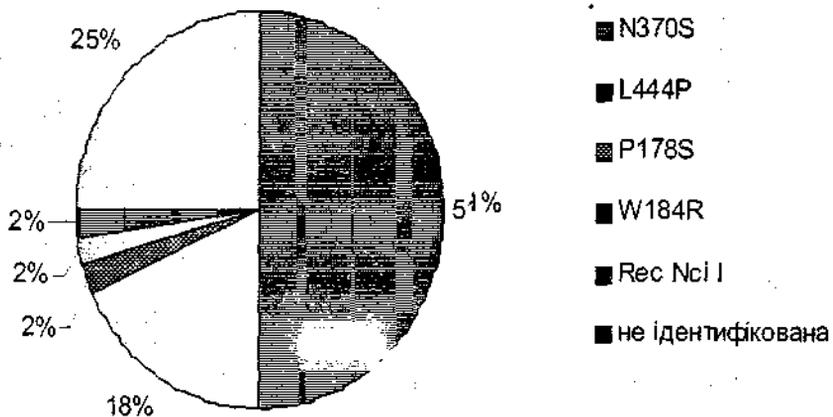
ше у них було виявлено мутацію N370S (51%). Мутація L444P була знайдена у 18% пацієнтів з I типом ХГ. В 25% пацієнтів з I типом ХГ мутації в гені GBA поки що не ідентифіковано.

Як і очікувалось, у пацієнтів з ХГ з України, які є гомозиготами за мутацією N370S, перебіг хвороби супроводжується органомегалією, незначною панцитопенією, рідко геморагіями. Хоча у одного з цих пацієнтів (О.А.) була досить тяжка анемія в анамнезі та профузні носові кровотечі. Клінічні прояви захворювання у пацієнтів, які мають в одному алелі N370S, а в другому іншу мутацію, обумовлені природою цієї мутації.

Так, наприклад, пацієнти, генотип яких N370S/ L444P, а їх в нашій групі 6 осіб, мають не однакові клінічні прояви. Мутація L444P ускладнює розвиток хвороби, приєднуються тяжкі кісткові кризи. У пацієнта М.М., генотип якого N370S /Rec Nci I, хвороба стартувала стрімко з 10-літнього віку. В 10 років йому за життєвими показаннями було видалено масивну селезінку. У двох пацієнтів (Л.Л. та Д.І.) було знайдено прості алелі з поодинокими рідкісними мутаціями, P178S та W184R, відповідно, у компаунді з N370S.

У трьох пацієнтів з клінічним I типом хвороби Гоше не виявлено жодного мажорного алеля, який би ніс мутацію N370S, L444P чи 84GG.

У одного з цих пацієнтів (М.В.) маніфестація захворювання розпочалася в віці 4 місяців тяжкою панцитопенією. Далі прогресувала органомегалія, та приєдналися інфекційні захворювання. В віці 4 років пацієнт помер. Очевидно, що при такому розвитку хвороби, ми не знайшли таку мутацію, як N370S.



Діаграма. Розподіл спектра мутацій в гені *GBA* у пацієнтів з I типом ХГ

У другого пацієнта з I типом ХГ (К.Н.) в анамнезі часті кровотечі, в результаті чого пацієнт постійно знаходився в реанімаційній палаті, болі в кістках, тяжкість при переміщенні, органомегалія.

Третій пацієнт з цієї групи (Ю.О.), якому 3 роки, страждає на тяжку анемію (Hb56г/л), гепатоспленомегалію.

За даними клінічних обстежень було встановлено III нейропатичний тип ХГ у 3 осіб. У жодного з них не було знайдено мажорних мутацій в гені *GBA*. Один пацієнт (М.Д.) мав рідкісні поодинокі мутації в обох алелях (генотип G377S/с 999G?A). Пацієнт М.С. мав рідкісну поодинокую мутацію D409H в одному алелі і комплекс з двох рідкісних мутацій R120W та G202R в другому. У пацієнта Н.Т. не було знайдено ні одного мажорного алеля. Генотип-фенотипові особливості у цих пацієнтів ми детально розглянемо в наступних публікаціях. Слід зазначити, що в українській популяції не знайдено жодного пацієнта з гострою нейропатичною формою ХГ (II тип). Це може бути пов'язано з труднощами клінічної діаг-

ностики через досить швидкі та прогресуючі порушення нервової системи в ранньому віці.

В діагностиці всього різноманіття клінічних фенотипів ХГ значення клінічних, параклінічних, гістологічних, біохімічних та молекулярно-генетичних методів не рівноцінне. В даний час діагностика ХГ базується на таких послідовних етапах:

1) клінічне та параклінічне обстеження;

2) специфічне біохімічне обстеження (визначення глюкоцереброзидазної та хітотриозидазної активності);

3) молекулярно-генетичний аналіз.

Виражена генетична гетерогенність та клінічний поліморфізм ХГ, як і при інших спадкових хворобах обміну, виключають точну діагностику на клінічному етапі. Клінічні та параклінічні методи надають можливість лише запідозрити захворювання [15]. Слід, однак, зазначити, що від точності попереднього клінічного діагнозу у значній мірі залежить якість та ефективність подальшого високоспецифічного лабораторного об-

стеження. Молекулярно-генетична діагностика важлива, якщо дані попередніх діагностичних процедур неоднозначні і потребують подальших досліджень.

Висновки

1. Використання «гніздової» полімерно-ланцюгової реакції є необхідним етапом молекулярно-генетичної діагностики хвороби Гоше в зв'язку з необхідністю чіткої локалізації мутації в функціональному гені *GBA*;

2. Молекулярно-генетична діагностика повинна виступати одним з основних етапів діагностичного алгоритму при підозрі на ХГ;

3. Сумарна частка мажорних мутацій в гені *GBA* в пацієнтів з ХГ з України склала 57,7% та дещо нижча за середню по Європі (65,1%);

4. Отримані дані генотип-фенотип кореляції в пацієнтів з ХГ з України доповнюють існуючу інформацію про інші популяції та суттєво не відрізняються;

5. Молекулярно-генетичні методи в поєднанні з клінічними, параклінічними та іншими методами є інформативними для проспективного та ретроспективного медико-генетичного консультування.

Перелік літератури

1. Горбунова В. Н., Баранов В. С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. — 1997. — Санкт-Петербург: Специальная литература. — С. 286.
2. Sidransky E., Tayebi N., Ginnes E. I. Diagnosing Gaucher disease // *Clinical Pediatrics*. — 1995. — 34, № 7. — P. 365–371.
3. Beutler E., Grabowski G. A. Gaucher disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. — New York: McGraw-Hill. — 2001. — P. 3635–3668.
4. Cox T. M. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses // *J. Inher. Metab. Dis.* — 2001. — 24. — (Suppl.2). — P. 106–121.
5. Hodanova K. et al. Analysis of the β -glucocerebrosidase gene in Czech and Slovak Gaucher patients: mutation profile and description of six mutant alleles // *Blood Cells, Molecules, and Diseases* — 1999. — 25, № 18. — P.287–298.
6. Mistry P. K., Cox T. M. The glucocerebrosidase locus in Gaucher's disease: molecular analysis of lysosomal enzyme // *J. Med Genet.* — 1993. — 30. — P 889–894.
7. Херрингтон С., Макги Дж. Молекулярная клиническая диагностика. — 1999. — Мир. — С. 558.
8. Stone D. L., Tayebi N., Orvisky E. et al. Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. // *Hum. Mut.* — 2000. — 15. — P. 181–188.
9. Інформаційний ресурс бази даних мутацій www.hgmd.org.
10. Koprivica V., Stone D.L., Park J.K. et al. Analysis and Classification of 304 Mutant Alleles in Patients with Type 1 and Type 3 Gaucher Disease // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — 66. — P.1777–1786.
11. Germain D. P. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics // *Clin Genet.* — 2004. — 65, № 2. — P 77–86.
12. Gurakan F., Terzioglu M., Kocak N., Yuca A., Ozen H., Cilliv G., Emre S. Analysis of three mutations in Turkish children with Gaucher disease // *J. Inher. Metab. Dis.* — 1999. — 22. — P. 947–948.
13. Ida H., Rennert O.M., Ito T., Maekawa K., Eto Y. Type 1 Gaucher Disease: Phenotypic Expression and Natural History in Japanese Patients // *Blood Cells, Molecules and Diseases*. — 1998. — 24, №5. — P. 73–81.
14. Diaz G. A., Geld B. D., Risch N. et al. Gaucher disease: The Origins of the Ashkenazi Jewish N370S and 84GG Acid β -Glucocerebrosidase Mutations // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — 166. — P.1821–1832.
15. Colombo R. Age estimate of the N370S mutation causing Gaucher disease in

Ashkenazi Jews and European Populations // *Am. J. Hum. Genet.*—2000.—66.— P692-697.

Представлено Л. Л. Лукаш
Надійшла 15.10.2006

ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ГОШЕ

А. Н. Недобой¹, Н. В. Ольхович¹,
Н. А. Пичкур², Н. Г. Горovenko²

¹Украинская детская специализированная больница "ОХМАТДЕТ", Украина, 01135, Киев, ул.Черновола 28/1, факс (044) 236-61-65, тел.(044) 236-69-42

²Кафедра медицинской генетики НМАПО им. П.Л.Шупика, Украина, 04112, Киев, ул.Дорогожицкая, 9, тел.(044) 205-90-27, 205-48-13

Систематизированы данные мажорных мутаций в гене *GBA* на примере 8 европейских стран. Обследовано 27 пациентов из 26 семей с БГ в Украине на наличие мажорных мутаций (N370S, L444P и 84GG). Суммарная частота мажорных мутаций в гене *GBA* в украинских пациентов с БГ составила 57,7%, что незначительно ниже, чем средняя по Европе (65,1%). Частая мутация N370S составляет 42,3%, что мало отличается от европейской (40,5%). Проанализированы генотип-фенотип корреляции у пациентов с БГ.

Ключевые слова: Болезнь Гоше, мажорные мутации, европейская популяция, диагностические методы, генотип-фенотип корреляции.

PECULIARITIES OF THE MOLECULAR GENETICS DIAGNOSTICS OF GAUCHER DISEASE

A. Nedoboy¹, N. Olkhovich¹, N. Pichkur², N. Gorovenko²

¹Ukrainian Children Hospital "OKhMATDET", Ukraine, 01135, Kyiv, Chernovola str. 28/1, tel.: (044) 236-61-65, 236-12-76

²National Medical Academy of Postdiploma Education, Ukraine, 04112, Kyiv, Dorogozhycka str., 9, tel.: (044) 205-90-27, 205-48-13

The figures obtained for the major mutations in *GBA* gene in 8 European countries were systematized. 27 patients with Gaucher disease from 26 Ukrainian families were examined for the major mutations (N370S, L444P and 84G). The frequency of the major mutations in *GBA* gene is 57.7% for Ukrainian patients, which is slightly lower than one for European patients (65.1%). Particular mutation N370S was reported for 42.3% that is close to the European figure (40.5%). Genotype-phenotype correlations for the patients with Gaucher disease were analyzed.

Key words: Gaucher disease, major mutations, European population, diagnostics methods, genotype-phenotype correlations.

УДК 61:551.521

ЧЕРНОБЫЛЬСКАЯ КАТАСТРОФА И ПРОБЛЕМЫ МАЛЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ

Э. А. ДЕМИНА

Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 45

Особенности действия радиации в диапазоне малых доз — одна из наиболее актуальных медико-биологических проблем в постчернобыльском периоде. В работе исследованы цитогенетические показатели в соматических клетках участников ликвидации последствий аварии (УЛПА) на Чернобыльской АЭС в зависимости от значения поглощенной дозы ионизирующего излучения и класса заболеваний в отдаленные сроки. Установлено, что малые дозы поглощенной радиации являются статистически значимыми факторами риска возникновения злокачественных новообразований. Сохранение зависимости “доза — эффект” для лучевых цитогенетических маркеров (дицентрических и кольцевых хромосом) в соматических клетках УЛПА со злокачественными новообразованиями в отдаленные сроки указывает на радиогенный характер этих заболеваний.

Ключевые слова: малые дозы радиации, цитогенетические показатели, злокачественные новообразования.

Вступление. Настоящая статья посвящена светлой памяти профессора Л.П. Киндзельского, председателя Чернобыльского экспертного совета по установлению причинной связи заболеваний с работами в зоне аварии — руководителя данной работы.

Учитывая важность использования опыта Чернобыльской катастрофы для объективизации ее неблагоприятных медико-биологических последствий, и через 20 лет со дня происшедшего трагического события исследования в этом направлении интенсивно продолжаются [1–6]. Возникла беспрецедентная ситуация, когда значительная часть населения Украины продолжает жить и работать в условиях длительного воздействия малых доз радиации. Предметом пристального изучения постлучевых последствий аварии является когорта “ликвидаторов”, показатели заболеваемости которых в несколько раз превышают характерные для населения Украины [7]. Однако со временем стало

очевидно, что по сути авария, происшедшая на Чернобыльской АЭС, носит глобальный трансграничный характер, ликвидировать последствия которой невозможно, и потому она получила статус "Чернобыльской катастрофы". Хотя термин "ликвидаторы" уже вошел в государственные документы, научные отчеты и публикации, как отечественные так и зарубежные, более корректно этих лиц называть участниками ликвидации последствий аварии (УЛПА).

Определенный интерес представляет возрастание у УЛПА злокачественных новообразований, возникновение части которых может быть радиационно индуцированным [8-10]. Несмотря на то, что дозиметрическое обеспечение когорты УЛПА остается одной из нерешенных проблем, необходимо проводить исследование роли радиационного компонента в возникновении дополнительных случаев рака на основе документированных доз [11].

Особую актуальность после катастрофы на ЧАЭС приобретают данные цитогенетического обследования облученных лиц, поскольку они могут быть одним из объективных критериев формирования групп повышенного риска возникновения различных нозологических форм заболеваний, в том числе онкологических [12].

Ряд оптимистических высказываний в постчернобыльский период о том, что радиационно-индуцированный генетический груз незначителен, оказались преждевременными. У лиц, пострадавших вследствие аварии на ЧАЭС, отмечается повышенный уровень аберрации хромосом в соматических клетках [13-19], а также убедительно доказана причинно-следственная связь между

заболеваемостью детей раком щитовидной железы и облучением [20]. На представленной выборке (свыше 3 тыс. чел.) показана достоверная корреляция между риском развития злокачественных новообразований и частотой хромосомных аберраций [21]. Исходя из этого, лица с высокой частотой структурных перестроек хромосом относятся к группе повышенного канцерогенного риска [22], а наблюдаемый уровень хромосомных аберраций может служить прогностическим тестом для раннего выявления лиц с повышенным риском развития рака [4, 9].

Отметим, что нормирование действия радиации на организм человека осуществляется согласно установленному "лимиту дозы" [23]. Так как дозовые границы аварийного облучения ориентируются на предупреждение развития острой лучевой болезни, то эффектам, индуцированным при меньших лучевых нагрузках, в том числе в области малых доз, в дочернобыльском периоде уделялось недостаточно внимания.

В данной работе исследованы цитогенетические показатели в соматических клетках УЛПА в зависимости от величины поглощенной дозы радиации и класса заболеваний в отдаленные сроки после аварии на ЧАЭС.

Материалы и методы

Экспонированная группа состоит из 17 000 УЛПА, обратившихся в Киевский чернобыльский экспертный совет по установлению причинной связи заболеваний и смертности с работами по ликвидации последствий аварии на ЧАЭС, с документированными дозами облучения.

В работе использован метод, позволяющий исследовать эпидемиологические показатели при "внутреннем сравнении" в зависимости от полученной дозы внешнего облучения [24]. Для анализа были отобраны УЛПА с документально подтвержденными величинами полученных доз внешнего облучения в пределах от 1 до 100 сГр. С целью выявления дозовых, возрастных особенностей распределения заболеваний исследуемая группа УЛПА разделена на девять дозовых диапазонов, семь возрастных категорий.

Материалом цитогенетического исследования являлись лимфоциты периферической крови пострадавших лиц, культивируемые по общепринятой методике. Регистрировали все виды аберраций хромосом, доступные для анализа при традиционной окраске хромосом. У каждого обследованного анализировали 200–300 метафаз.

Для статистической оценки отличий лучевых маркеров у лиц со злокачественными новообразованиями (ЗН) и без них применялся метод линейной

регрессии и корреляционный анализ на основе зависимости "доза — эффект", где поясняющей переменной является доза, а откликом — цитогенетический показатель.

Результаты и обсуждение

Установлено, что по частоте заболеваний первые четыре ранговых места в исследуемой когорте занимают заболевания нервной системы и органов чувств, органов пищеварения, органов кровообращения и ЗН.

Особый интерес представляет класс ЗН. Характер дозовой зависимости их частоты изучен с использованием кусочно-линейных сплайнов, а также вычислением верхних и нижних границ доверительных интервалов, отвечающих 5% уровню значимости (напомним, что в биологии и медицине общепринятым является 95% доверительный уровень). Данные указывают на тенденцию снижения частоты ЗН с увеличением дозы в интервале 1–85 сГр для обеих возрастных групп: моложе и старше

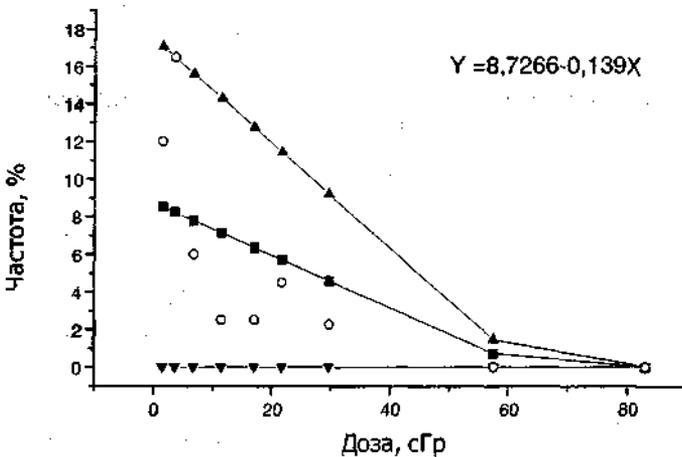


Рисунок 1. График сплайновой регрессионной зависимости частоты злокачественных новообразований от дозы в группе УЛПА моложе 40 лет. Крайние линии — доверительные интервалы

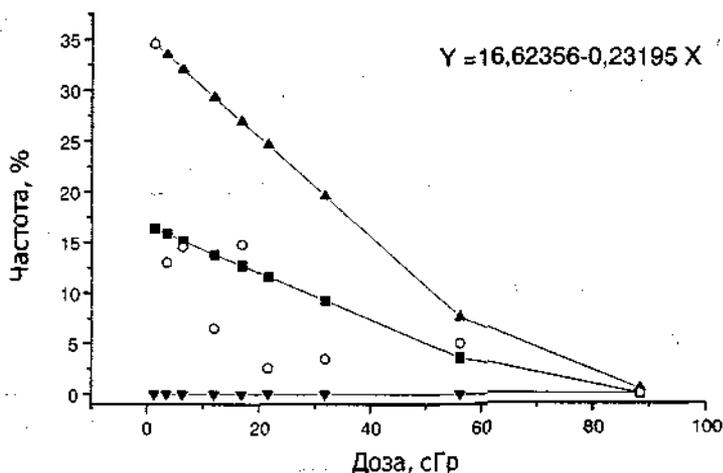


Рисунок 2. График сплайновой регрессионной зависимости частоты злокачественных новообразований от дозы в группе УЛПА старше 40 лет. Крайние линии — доверительные интервалы

40 лет (рис. 1 и 2). Известно, что статистическая точность оценки наблюдаемой величины эффекта выражается вышеуказанным доверительным интервалом, позволяющим оценить, в каких пределах может находиться истинное значение параметра. Длина доверительных интервалов в данном случае также уменьшается с дозой, означая, что с увеличением дозы уменьшается вариабельность частоты ЗН и, значит, частоту ЗН можно прогнозировать с высокой точностью.

Для проверки факта повышения частоты ЗН в области действия низких доз радиации использована гипотеза о равенстве двух вероятностей на основании статистического критерия 2S. Для применения этого критерия, в отличие от критерия χ^2 , нет необходимости считать исследуемые частоты независимыми случайными величинами. Анализ этих результатов (табл. 1) показывает, что вероятность случайного события, состоящего в том, что УЛПА

со ЗН подверглись облучению в диапазоне от 1 до 3 сГр или от 3 до 5 сГр, статистически значимо превышает соответствующую вероятность для когорты в целом. Кроме того, для диапазонов от 25 до 50 сГр и от 75 до 100 сГр эта вероятность статистически значимо меньше, чем соответствующая вероятность в целом по когорте. Для других классов заболеваний не наблюдается статистически значимых различий вероятностей, соответствующих любым диапазонам. Это подтверждает факт повышения частоты ЗН в области малых доз и по сути является основой для гипотезы: *малые дозы поглощенной радиации представляют собой статистически значимые факторы риска возникновения злокачественных новообразований.*

В литературе широко дискутируется проблема влияния малых доз облучения на возникновение ЗН. Существует три группы ученых, которые придерживаются не только разных, но и противополож-

Таблица 1. Частоты встречаемости диапазона доз среди лиц с заболеваниями из разных классов и признаки статистической значимости их различий

Диапазоны доз, сГр	Классы заболеваний и частоты								
	2		7		8		10		Когорта
	Частота	+/-	Частота	+/-	Частота	+/-	Частота	+/-	Частота
1-3	0,238	1	0,043	0	0,062	0	0,036	0	0,057
3-5	0,168	1	0,061	0	0,091	0	0,071	0	0,069
5-10	0,182	0	0,110	0	0,115	0	0,131	0	0,120
10-15	0,077	0	0,109	0	0,120	0	0,116	0	0,106
15-20	0,084	0	0,087	0	0,071	0	0,085	0	0,093
20-25	0,091	0	0,159	0	0,137	0	0,142	0	0,152
25-50	0,140	1	0,334	0	0,337	0	0,356	0	0,323
50-75	0,021	0	0,073	0	0,049	0	0,045	0	0,060
75-100	0,000	1	0,024	0	0,018	0	0,018	0	0,020

Примечание. В колонке +/- "1" означает наличие статистически значимых отличий между вероятностями, а "0" — его отсутствие. В колонке "Когорта" приведены частоты соответствующих диапазонов доз в когорте в целом, где включены также классы 2 (злокачественные новообразования), 7 (заболевания нервной системы), 8 (заболевания органов кровообращения) и 10 (заболевания органов пищеварения).

ных взглядов на эту проблему. Одни, руководствуясь линейной концепцией, отвергают какие-либо особенности эффектов малых доз [25], вторые — признают явление гормезиса, т.е. существование позитивного действия малых доз излучения [26], а третьи — предупреждают про повышенную опасность облучения в малых дозах. Остановимся на этой точке зрения более подробно, поскольку она отражает наиболее консервативную оценку эффекта малых доз — результаты анализа характеризуют самые неблагоприятные последствия исходного события.

Известный американский исследователь Дж. Гофман утверждает, что "не существует пороговой дозы для возникновения рака и даже минимально возможные дозы и мощности дозы ведут к возникновению рака" [27]. Этот вывод

очень ответственный в практическом аспекте, так как облучению в диапазоне малых доз население подвергается за счет природных, профессиональных, медицинских диагностических экспозиций. Радиационный канцерогенез по механизму одноклеточного действия, на взгляд автора, не только возможен, но является доминирующим в сравнении с канцерогенезом, который возникает по типу межклеточного воздействия. Вклад межклеточного канцерогенеза (а это квадратичный член в линейно-квадратичном уравнении "доза — эффект") незначителен при облучении в малых дозах. Поэтому минимально возможная доза облучения — это один трек на ядро плюс время, необходимое для репарации радиационно-индуцированных повреждений. Такой же точки зрения придерживается Ю.С.Рябухин [28], считая,

что главным доказательством в пользу отсутствия порога при оценке биологических эффектов есть то, что попадание даже в одну клетку обуславливает риск стохастического эффекта, т.е. ЗН. Важным этапом в развитии данного направления было открытие канадским ученым А. Реткау высокой эффективности влияния малых доз радиации на фосфолипидные мембраны [29]. Он показал, что облучение при низкой интенсивности является в 5000 раз более эффективным по сравнению с высокоинтенсивным облучением.

Полученные нами данные об эффективности низких доз радиации подтверждаются работами Е.Б. Бурлаковой [30], согласно которым дозовая зависимость показателей заболеваемости и смертности от ЗН для УЛПА не является монотонной (максимальные значения этих показателей приходятся на дозу 10–15 сГр, а минимальные — на дозу 25 сГр). Авторы полагают, что отсутствие монотонной зависимости частоты ЗН от дозы облучения, появление максимумов при более низкой дозе «скорее подтверждают радиационную природу возникновения раков при низких дозах облучения, чем опровергают».

Итогом нашей работы может быть вывод о том, что радиационно-эпидемиологические исследования в послечернобыльском периоде должны дать прямой ответ о вреде или безопасности малых доз облучения. Однако проблема канцерогенеза, как стохастического эффекта влияния малых доз облучения, остается противоречивой [25–30]. Поэтому, на наш взгляд, наиболее плодотворным является комбинированный подход к решению данной проблемы: анализ данных радиационно-эпидеми-

ологических исследований, подтверждаемый доказательствами, полученными в лабораторных исследованиях [19].

Прежде чем интерпретировать данные цитогенетического обследования УЛПА мы провели сравнение средней дозы по выборке с оценкой по калибровочной дозовой кривой, полученной нами ранее. Средняя доза по выборке равна 19,9 сГр, а отклонение её от оценки калибровочной кривой — 3,08, что составляет 15,4% ошибки. Поскольку обследование УЛПА проводили в отсроченные постлучевые сроки, на протяжении которых происходила элиминация аберрантных клеток, то величину ошибки можно считать приемлемой, а величины зарегистрированных доз — достоверными. Средний коэффициент равномерности (отношение средней частоты хромосомных аберраций к средней частоте поврежденных клеток) для анализируемой выборки равен 0,985; и поэтому в целом УЛПА подверглись относительно равномерному облучению.

Для анализа отличий лучевых маркеров (дицентриков, центральных колец) у УЛПА с заболеваниями из различных классов (табл. 2) вычислены коэффициенты корреляции цитогенетических показателей с дозой облучения. Эти результаты свидетельствуют, что в группе УЛПА со ЗН (1) коэффициенты корреляции лучевых маркеров (0,59 и 0,56) с дозой значительно превышают соответствующие коэффициенты в группах УЛПА с заболеваниями нервной системы (2), системы кровообращения (3), органов пищеварения (4) и др. классов заболеваний (5).

Это может означать, что, несмотря на отдаленные сроки обследования и

Таблица 2. Коэффициенты корреляции цитогенетических показателей с дозой облучения у УЛПА с заболеваниями различных классов

Цитогенетические показатели (частота на 100 метафаз)	Классы				
	1	2	3	4	5
Клетки с aberrациями	0,442	0,198	0,290	0,172	0,220
Aberrации	0,412	0,166	0,174	0,176	0,146
Хроматидные aberrации	-0,097	0,191	0,194	-0,149	0,078
Хромосомные aberrации	0,572	-0,027	0,262	0,206	0,153
Парные фрагменты	0,224	-0,004	0,209	0,159	0,107
Ацентрические кольца	0,385	-0,168	0,023	-0,010	-0,072
Центрические кольца	0,561	-0,215	-0,028	-0,010	-0,105
Дицентрики	0,594	0,152	0,094	0,100	0,110
Транслокации	-0,188	-0,020	0,375	0,167	0,158
Нестабильные aberrации с парными фрагментами	0,000	-0,126	-0,067	-0,065	-0,111
Нестабильные aberrации без парных фрагментов	-0,199	-0,242	0,042	-0,099	-0,102

связанную с этим элиминацию значительной части лучевых маркеров из пула крови, только в группе УЛПА со ЗН сохраняется зависимость “доза — эффект”. В остальных же группах эта зависимость либо слабо выражена, либо отсутствует. Мы полагаем, что это может быть связано с недостаточной интенсивностью антиканцерогенной защиты организма при действии радиации в изученном диапазоне доз, которая включает комплекс сложных процессов, в том числе репарационные.

С другой стороны, хорошо известно, что взаимодействие ионизирующего излучения с веществом приводит к передаче энергии, идущей на ионизацию и возбуждение молекул. При больших дозах ведущее положение в развитии радиобиологических эффектов играет ионизация, в то время как при малых — возбуждение молекул и их систем. Исходя из этого, одной из возможных ин-

терпретаций полученных нами эффектов может являться предположение [31], что действие малых доз вызывает в организме человека преимущественно электронно-возбужденное состояние биомолекул. Процессы возбуждения физиологически более опасны, так как в этих случаях возможно торможение апоптоза aberrантных клеток, что является одним из факторов риска возникновения ЗН. Уменьшение случаев ЗН в исследуемой нами выборке с дозой облучения может быть обусловлено превалированием процессов ионизации биомолекул, которые оказывали стимулирующее влияние на процесс апоптоза клеток.

Выводы

Малые дозы поглощенной радиации являются статистически значимыми факторами риска возникновения злока-

генетичних новообразований. Сохранение зависимости "доза — эффект" для ключевых цитогенетических маркеров в соматических клетках УЛПА со временем — естественными новообразованиями в отдаленные сроки после Чернобыльской аварии указывает на радиационный характер этих заболеваний.

Список литературы

- Djomina E. A.* Radiation Epidemiological Studies in a Group of Liquidators of the Chernobyl Accident Consequences // *Chernobyl — 20 Years Later, Experiences and Lessons for the Future: Intern. Congr., Berlin, 2006.* — P. 62–63.
- Djomina E. A., Ryabchenko N. M.* An Estimation of Human Individual Radiosensitivity in the Post-Chernobyl Period. // *Chernobyl — 20 Years Later, Experiences and Lessons for the Future: Intern. Congr., Berlin, 2006.* — P. 64–65.
- Гриневич Ю. А., Демина Э. А.* Иммуно- и цитогенетические эффекты плотной и редкоизирующей излучений / Под ред. А. А. Ярилина. К.: Здоров'я, 2006. — 200 с.
- Севаньяев А. В., Михайлова Г. Ф., Потетня О. И. и др.* Результаты динамического цитогенетического наблюдения за детьми и подростками, проживающими на радиоактивно-загрязненных территориях после Чернобыльской аварии // *Радиация, биология, Радиоэкология, 2005.* — 45, № 1. — С. 5–15.
- Педан Л. Р.* Радіоіндукований цитогенетичний ефект і його модифікація in vitro в лімфоцитах периферичної крові осіб, які постраждали від дії факторів Чернобыльської аварії: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2005. — 20 с.
- Мазник Н. О.* Цитогенетичні ефекти як біологічний індикатор дії іонізуючої радіації в низьких дозах у ранні та віддалені строки після опромінення у осіб Чернобыльського контингенту: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. — Київ, 2005. — 46 с.
- Сердюк А. М.* Чернобыль и здоровье населения Украины // *Довкілля та здоров'я.* — 1998. — 2, № 5. — С. 30–35.
- Присяжнюк А. Е., Грищенко В. Г., Федоренко З. П. и др.* Эпидемиологическое изучение злокачественных новообразований у пострадавших вследствие аварии на ЧАЭС. Итоги, проблемы и перспективы // *Международн. журн. радиац. медицины.* — 1999. — 2, № 2. — С. 42–50.
- Нагорная А. М.* Динамика показателей заболеваемости по некоторым видам патологии у участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС // *Врачебн. дело.* — 1993. — № 9. — С. 44–47.
- Здоров'я населення України та діяльність лікувально-профілактичних закладів системи охорони здоров'я: щорічна доповідь / Під ред. А. М. Сердюка.* — Київ. — 1998. — С. 225–230.
- Чумак В. В., Бахамова Е. В., Мусияченко Н. В. и др.* Дозиметрия ликвидаторов через 14 лет после Чернобыльской аварии: проблемы и достижения // *Международн. журн. радиац. медицины, 2000.* — 1, № 5. — С. 26–45.
- Новицкая Н. Н., Снегирева Г. П., Хизинс Е. Д.* Результаты цитогенетического обследования участников ликвидации аварии на ЧАЭС // *Медицина труда и пром. экология, 2000.* — № 8. — С. 16–20.
- Моисеевко В. В.* Применение методов биофизического моделирования для ретроспективной оценки доз по хромосомным абберациям в различные сроки после облучения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Обнинск. — 1993. — 24 с.
- Шевченко В. А., Семов А. Б., Акаева Э. А. и др.* Цитогенетические эффекты у лиц, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС // *Радиация, Биология, Радиоэкология.* — 1995. — 35, вып. 5. — С. 646–654.
- Севаньяев А. В.* Современное состояние вопроса количественной оценки цитогенетических эффектов в области низких доз радиации // *Радиобиология.* — 1994. — № 11. — С. 600–605.

16. Шеметун О. В. Хромосомні маркери дії радіації у віддалені строки після гострого та при хронічному опроміненні людини: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.— Київ.— 1998.— 18 с.
17. Пилинская М. А., Шеметун А. М., Дыбский С. С. и др. Результаты 15-летнего цитогенетического мониторинга за контингентами приоритетного наблюдения, пострадавшими от последствий Чернобыльской аварии // Международн. Журн. Радиацион. Медицины.— 2000.— № 1-2.— С. 268-269.
18. Djomina E. A. Statistical investigation of cytogenetic effects upon malignant neoplasms in liquidators of Chernobyl atomic power station accident // 10th International congress on anti-cancer treatment. Paris.— 2000.— P. 109.
19. Дьоміна Е. А. Радіогенні цитогенетичні ефекти у учасників ліквідації аварії на Чорнобильській АЕС: Автореф. дис. ... докт. біол. наук.— Київ.— 2002.— 36 с.
20. Тронько Н., Богданова Т., Терещенко В., Лихтарев И. Рак щитовидной железы у детей и подростков Украины после Чернобыльской аварии (1986–1990) // Отдаленные медицинские последствия Чернобыльской катастрофы: Материалы 2-й Международн. конф. Киев, 1998.— С. 144–145.
21. Hagmar L., Brogger A., Hansteen I. L. et al. Cancer risk in Humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes // Cancer Res.— 1994.— 54.— P. 2919-2922.
22. Sorsa M., Wilbourn J., Vainio H. // Mechanisms of carcinogenesis in Risk Identification. Lyon: IARS.— 1992.— P. 543-554.
23. Лютых В. П., Долгих А. П. Нестохастические эффекты длительности хронического облучения человека ионизирующим облучением в малых дозах // Мед. радиология и радиационная безопасность.— 1997.— 42, № 3.— С. 51-58.
24. Гастева Г. Н., Сорокин А. В., Фролов Г. П. и др. Клинико-дозиметрическая характеристика отклонений в состоянии здоровья для персонала плутониевого производства по результатам выборочного эпидемиологического обследования // III съезд по радиационной безопасности: Тез. докл. (Пушино, 1997).— М.— 1997.— 1.— С. 177-178.
25. Ярмоненко С. П. Проблемы радиобиологии человека в конце XX столетия // Мед. радиология и радиационная безопасность.— 1998.— № 1.— С. 30-36.
26. Кузин А. М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. М.: Наука, 1995.— 158 с.
27. Гофман Дж. Рак, вызываемый облучением в малых дозах: информационный анализ проблемы. Пер. с англ. Под ред. Е. Б. Бурлаковой, В. Н. Лысцова. М.: Наука, 1994.— 1.— 320 с., 2.— 250 с.
28. Круглый стол "Актуальные вопросы радиационной медицины" (Обнинск, 22 февраля 1996 г.) // Мед. радиология и радиационная безопасность.— 1996.— № 6.— С. 70-73.
29. Petkau A. Radiation effects with a model lipid membrane // Can. J. Chem., 1971.— 49.— P. 1187-1196.
30. Бурлакова Е. Б., Голощапов А. Н., Горбунов Н. В. и др. Особенности биологического действия малых доз облучения // Радиационная биология. Радиационная экология.— 1996.— № 4.— С. 610-631.
31. Ключин Д. А., Демина Э. А., Петунин Ю. И., Ганина К. Л. Малые дозы ионизирующей радиации как фактор риска возникновения злокачественных новообразований у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС // Променива діагностика, променива терапія. Київ: ІВО "Медицина України".— 2001.— Вип. 9.— С. 94-100.

Представлено И. Р. Барыляком
Поступила 24.03.2006

**ЧОРНОБИЛЬСЬКА КАТАСТРОФА ТА
ПРОБЛЕМИ МАЛИХ ДОЗ РАДІАЦІЇ**

Е. А. Дьоміна

Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецько-
го НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Особливість дії радіації в діапазоні малих
доз — одна з найбільш актуальних меди-
ко-біологічних проблем в постчорнобиль-
ському періоді. В даній роботі досліджено
цитогенетичні показники в соматичних
клітинах учасників ліквідації наслідків аварії
(УЛНА) на Чорнобильській АЕС в залеж-
ності від значення поглинутої дози іонізу-
ючого опромінення і класу захворювання у
віддалені терміни. Встановлено, що малі
дози поглинутої радіації є статистично зна-
чущими факторами ризику виникнення
злоякісних новоутворень. Збереження за-
лежності "доза — ефект" для променеви-
х цитогенетичних маркерів (дицентричних
та кільцевих хромосом) в соматичних
клітинах УЛПА із злоякісними новоутворен-
нями у віддалені терміни вказує на радіо-
генний характер цих захворювань.

Ключові слова: малі дози радіації, цитогене-
тичні показники, злоякісні новоутворення.

**THE CHERNOBYL CATASTROPHY AND
PROBLEMS OF LOW DOSE RADIATION**

E. A. Dyomina

R. Ye. Kavetskyi Institute of Experimental
Pathology, Oncology and Radiobiology of
NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Peculiarities of radiation effects in low dose
range is one of the most actual medical and
biological problems in post Chornobyl period.
Cytogenetic parameters in somatic cells of
the participants of liquidation of the Chorno-
byl accident consequences in dependence of
disease class in the remote terms and values
of the absorbed dose were investigated in the
presented work. It was found out that low do-
ses of absorbed radiation is statistically sig-
nificant risk factor for malignant formation.
The observed dependence for radiation cyto-
genetic markers in somatic cells of liquidators
with malignant formations in the remote terms
indicates for their radiogenic character.

Key words: low doses of radiation, cyto-
genetic parameters, malignant formations.

УДК 577.213.3

ДОСЛІДЖЕННЯ МУТАНТНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНА Cx32 В РОДИНАХ ХВОРИХ З ДОМІНАНТНИМ ТИПОМ ШМТ З УКРАЇНИ

Н.В. ГРИЩЕНКО, О.О. СОЛОВЙОВ, Д.О. ГОЛОМІДОВ, Л.А. ЛІВШИЦЬ
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, Київ, Заболотного, 150,
e-mail: livshits@imbg.org.ua

Хвороба Шарко-Марі-Тус (ШМТ) є однією з найбільш розповсюджених спадкових невропатій, частота якої складає 1 : 2500. У даній роботі представлено аналіз мутантних варіантів гена Cx32 з використанням DGGE для пацієнтів із аутосомно-домінантною ШМТ1 та членів їх родин, у яких не було виявлено ШМТ1А-дуплікації. Ідентифіковано мутацію 65G>A у двох пацієнтів, у яких виявили змінений DGGE-профіль. Показано, що аналіз мутацій у гені Cx32 із використанням DGGE з наступним секвенуванням може ефективно використовуватися для скринінга мутацій у гені Cx32, ранньої диференційної діагностики ШМТ1 та генетичного консультування в сім'ях високого ризику даного захворювання.

Ключові слова: ШМТХ1, DGGE-аналіз, ген Cx32.

Вступ. Спадкова мотосенсорна невропатія, або хвороба Шарко-Марі-Тус (ШМТ) — це гетерогенна група захворювань, при якій уражаються периферичні нерви. ШМТ є одним із найбільш розповсюджених спадкових неврологічних захворювань, частота його в середньому складає 1 : 2500 [1, 2].

За типом успадкування виділяють аутосомно-домінантну, аутосомно-рецесивну та Х-зчеплену форми ШМТ.

Переважає більшість Х-зчеплених форм хвороби Шарко-Марі-Тус є домінантними (ШМТХ1). Вважається, що зчеплена зі статтю домінантна ШМТ — це друга після ШМТ1А за частотою розповсюдження форма спадкової невропатії (20% всіх випадків ШМТ) [3, 4]. Крім того, описано вже чотири типи Х-зчеплених рецесивних форм ШМТ (ШМТХ типів 2–5) [5, 6].

У проксимальній ділянці Х-хромосоми Хq13.1 в інтервалі 8 був картований ген Cx32 (GJB1 — gap junction protein, beta 1), який кодує ко-

нексин 32 — трансмембранний β -білок із родини коннексинів. [7]. Встановлено, що причиною патогенезу при ШМТХ1 є мутації в цьому гені.

Конексини беруть участь в утворенні міжклітинних щілинних контактів за рахунок суміщення мембранних пор [8]. Щілинні контакти, які сформовані прямою аппозицією олігомерних трансмембранних білків, дозволяють безпосередній обмін іонами і малими молекулами (<1kDa), представляючи, таким чином, додаткову систему метаболічних і електричних комунікацій між нейронами. Ці контакти особливо важливі і численні у нервовій тканині, що розвивається, але в багатьох структурах вони наявні й у дорослих тварин і людини. Класифікація конексинів проводиться за молекулярною вагою, і ця цифра винесена в назву білка.

Конексин 32 — це бета-білок з молекулярною вагою 32 кД, широко представлений у периферичних нервових волокнах та в клітинах печінки. Ген *Cx32* активно експресується в периферичній нервовій системі у насічках Шмідта-Лантермана, у перехватах Ранвье та в клітинах Шванна [9].

На сьогодні вже ідентифіковано близько 280 мутацій різного тилу в гені *Cx 32* [10], які призводять до розвитку X-зчепленої форми хвороби Шарко-Марі-Тус. Деякі мутації в гені *Cx 32* призводять до фенотипового прояву ШМТ із порушеннями центральної нервової системи або із нейросенсорною втрапою слуху [11].

Метою даної роботи був скринінг мутантних варіантів гена *Cx32* (GJB1) та точна ідентифікація мутацій в цьому гені в родинах з X-зчепленою домінантною формою ШМТ з України.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були зразки периферичної крові хворих на ШМТХ1 та членів їх сімей з України.

ДНК із зразків крові виділяли з використанням методів, які були описані раніше [12, 13].

Дизайн олігонуклеотидних праймерів із специфічними CG-”затискачами” для ампліфікації *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним аналізом методом денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE — denaturing gradient gel electrophoresis), гомологічні послідовностям екзонів 1В та 2 гена *Cx32* розробляли за допомогою програми WinMelt та бази даних NCBI BLAST Search. Для сиквенсації реакції послідовності 2-го екзона гена *Cx32* використовували праймери, описані раніше [9].

Праймери були нами синтезовані твердофазним фосфоамідитним методом на олігосинтезаторі Biosset, Росія.

Ампліфікацію *in vitro* екзонів 1В та 2 гена *Cx32* проводили в автоматичному режимі на термоциклері “2720 Thermal Cycler” фірми “Applied Biosystems” за схемою, яка наведена в табл. 1.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили методом DGGE із застосуванням Універсальної Системи для Детекції Мутацій Dcode™ фірми BIO-RAD в денатуруючому поліакриламідному гелі з подвійним градієнтом — акриламід (6–9% для фрагментів DC1 та DC2; 6–12% для фрагмента DC3) та денатуруючих агентів (формамід 0–32% та сечовини 0–5,6M), із співвідношенням акриламід та біс акриламід 19 : 1, в 1xTAE-буфері при 60 °C та 180V впродовж 8 годин з

Таблиця 1. Схема ампліфікації *in vitro* екзонів 1В та 2 гена Сх32

ПЛР-фрагмент	Етап і кількість циклів		Денатурація	Відпалювання праймерів	Синтез
	І	II			
DC1	I	1	95 °С — 3 хв.	58 °С — 45 сек.	72 °С — 30 сек.
	II	39	98 °С — 12 сек.	58 °С — 30 сек.	72 °С — 30 сек.
	III	1	94 °С — 10 хв.	58 °С — 15 хв.	37 °С — 10 хв.
DC2	I	1	95 °С — 3 хв.	60 °С — 45 сек.	72 °С — 30 сек.
	II	39	98 °С — 12 сек.	60 °С — 30 сек.	72 °С — 30 сек.
	III	1	94 °С — 10 хв.	60 °С — 15 хв.	37 °С — 10 хв.
DC3	I	1	95 °С — 3 хв.	57 °С — 2 хв.	72 °С — 30 сек.
	II	39	98 °С — 12 сек.	57 °С — 2 хв.	72 °С — 30 сек.
	III	1	94 °С — 10 хв.	57 °С — 15 хв.	37 °С — 10 хв.

наступною візуалізацією за допомогою забарвлення бромистим етидіумом і скануванням на УФ-трансліюмінаторі.

Секвенування фрагментів, в яких було виявлено змінений DGGE-профіль проводили за допомогою Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Sequencing Kit, Amersham Biosciences згідно з протоколом фірми із власними модифікаціями з наступним фракціонуванням фрагментів у 7% поліакриламідному ALF-гелі (співвідношення акриламід:біс акриламід — 24 : 1), що містив 0.6X TBE і 7М сечовину. Електрофоретичне фракціонування проводили з використанням автоматичного лазерного флуориметра ALF-express II фірми Amersham Biosciences при температурі 55°C, при 1000 V, 50 mA, 30 W протягом 5 год. Після сканування ALF-гель аналізували за допомогою програми ALFwin Sequence Analyser 2.11 (Amersham Pharmacia Biotech).

Результати та обговорення

Для даного дослідження для підтвердження діагнозу ШМТХ1 нами було відібрано 6 родин з домінантним

типом ШМТ, у яких в попередньому дослідженні не було виявлено ШМТ1А-дуплікації [14], а також при генеалогічному аналізі не було зафіксовано передачі захворювання від батька до сина, що давало нам підстави припускати домінантний Х-зчеплений тип успадкування ШМТ в цих родинах.

Мутації в екзонах 1В та 2 гена Сх32 було проскринено методом DGGE у 7 пацієнтів та 3 матерів (6 родин). В якості контролю використовували зразки ДНК здорових індивідів (донори крові).

Метод денатуруючого градієнтного гель-електрофореза використовується для скринінга мутацій в різних генах ядерної та мітохондріальної ДНК. Фракціонування продуктів ПЛР даним методом ґрунтується на різниці в температурі плавлення дволанцюгових молекул ДНК, які мають різний нуклеотидний склад [15]. В результаті цього в денатуруючих умовах проби, гетерозиготні за точковою мутацією, формують гомо- та гетеродуплекси, температура плавлення яких відрізняється, що після проведення DGGE можна побачити у

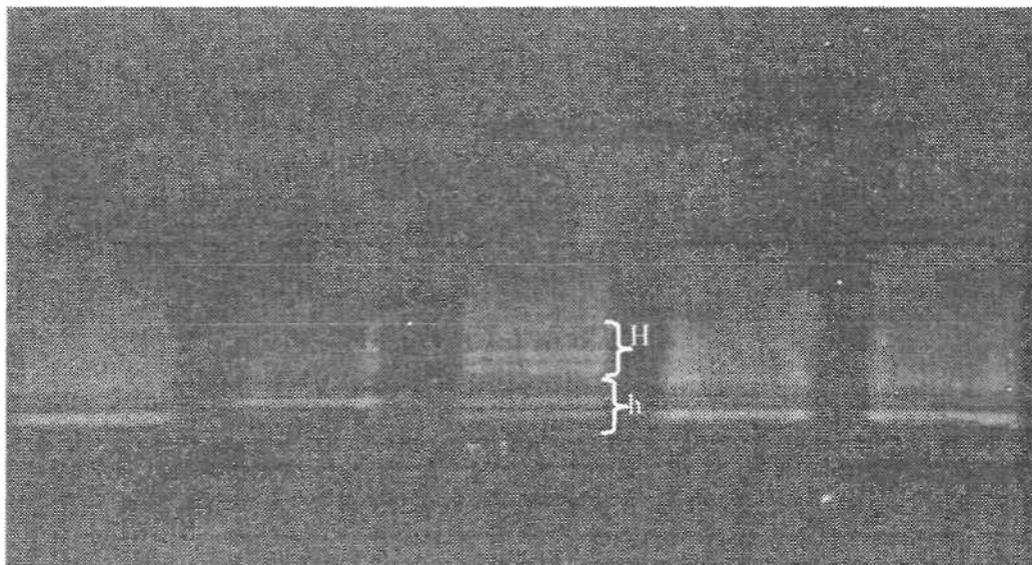


Рисунок 1. DGGE-електрофореграма фрагментів DC2 2-го ексона гена *Cx32*. 6–9 % поліакриламідний гель, градієнт денатуруючих агентів 0–80%.

H — гетеродуплекси; h — гомодуплекси; 1 — контрольна проба здорового чоловіка; 2 — мутація в гемізиготному стані у хворого чоловіка; 3 — суміш проб 1 та 2 (генотип норма/мутація); 4 — проба хворого на ШМТ без мутації в фрагменті DC2 2-го ексона гена *Cx32*; 5 — контрольна проба здорової жінки

вигляді 4 фрагментів різної довжини, які відповідають 2 гомодуплексам та 2 гетеродуплексам.

DGGE-профіль фрагментів DC1 та DC3 гена *Cx32* (екзон 1В та друга частина ексона 2) всіх досліджуваних нами хворих являв собою один гомодуплекс та не відрізнявся від норми.

У двох хворих братів з однієї родини DGGE-профіль фрагмента DC2 гена *Cx32* (перша частина ексона 2) було представлено гомодуплексом, який розташовувався вище за гомодуплекс контрольних зразків здорових індивідів (рис. 1). Оскільки досліджуваний ген локалізований на X-хромосомі, дані пацієнти з каріотипом 46XY мали лише по одній копії цього гена. ДНК матері цих хворих не було надано для подальшого аналізу, тому з метою підтвердження наявності абераційного варіан-

ту гена *Cx32* у цих хворих нами було штучно створено пробу, яка містила фрагмент DC2 одного з досліджуваних хворих, а також фрагмент DC2 здорового індивіда. Для запобігання впливу дозових ефектів при проведенні DGGE нами було змішано фрагменти DC2 хворого та здорового індивіда чоловічої статі у співвідношенні 1 : 1. В цій пробі було виявлено DGGE-профіль, представлений двома гомодуплексами та двома гетеродуплексами, який показано на рисунку 1.

Зважаючи на результати DGGE-аналізу фрагмента DC2 у двох братів, хворих на ШМТ, ми припустили наявність у них мутації в першій частині 2-го ексона гена *Cx32*. Для ідентифікації цієї мутації нами було проведено повний аналіз нуклеотидної послідовності 2-го ексона гена *Cx32* у цих пацієнтів. При

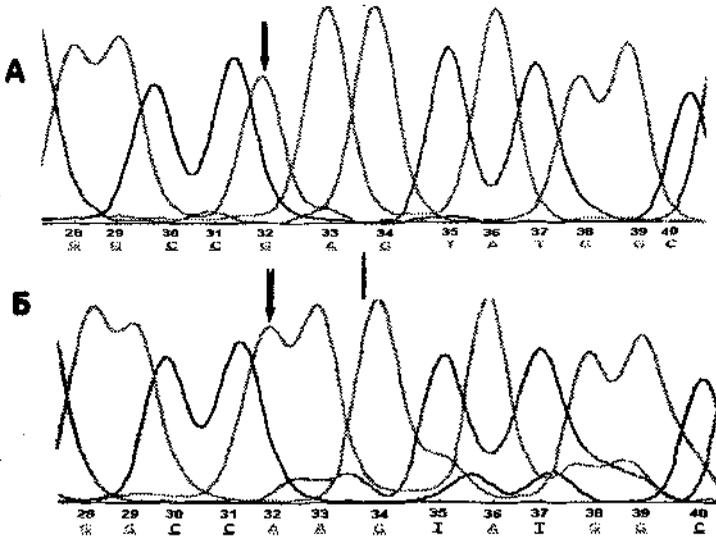


Рисунок 2. Аналіз нуклеотидної послідовності 2-го екзона гена *Sx32* за допомогою ALF express II
 А — фрагмент нормальної послідовності; Б — фрагмент послідовності з мутацією 65G>A в гемізіготному стані

аналізі результатів секвенування було встановлено, що в обох пацієнтів гуанін в положенні 65 триплету CGA замінений на аденін, в результаті чого утворюється триплет САА (рис. 2).

Така точкова заміна призводить до місенс-мутації Arg22Gln в білковому продукті *Sx32*, яку за фенотиповим ефектом відносять до мутацій середньої важкості.

Цікаво зазначити, що в досліджуваній родині у хворих спостерігали клінічну картину, яка є характерною для ШМТ1 і була схожою із тими симптомами, які мають пацієнти із типом ШМТ1А, а саме: значне зниження показника швидкості проведення нервового імпульсу (NCV) дистальних відділів кінцівок, демієліновий тип ураження нервового волокна. Крім того, у даних пацієнтів не відзначали порушень ЦНС або слуху, що є маркерними ознаками деяких мутацій в гені

Sx32. Таким чином, цим пацієнтам на основі лише клініко-генеалогічного аналізу не можливо було точно визначити тип ШМТ. Проте ці фенотипові ознаки є характерними саме для мутації Arg22Gln гена *Sx32*, що виявляється при порівняльному аналізі літературних даних про клінічну картину хворих на ШМТХ1, які є носіями цієї мутації [16].

Висновки

В результаті скринінгу мутантних варіантів у хворих на ШМТ1 із домінантним типом успадкування в родині виявлено двох пацієнтів із однієї родини, які несли мутацію 65G>A гена *Sx32* в гемізіготному стані. Цим хворим на підставі результатів молекулярно-генетичного та клініко-генеалогічного аналізів встановлено діагноз ШМТ типу Х1.

Запропонований підхід для скринінгу мутацій в гені *Sx32* методом DGGE

із наступним секвенуванням аберантних варіантів є ефективним при детекції мутантних варіантів цього гена як в гетерозиготному, так і в гемізіготному стані і може бути використаним для диференціальної ДНК-діагностики в родинях хворих з домінантним типом ШМТ, в яких не виявлено ШМТ1А-дуплікації. Така діагностика може стати ефективним засобом профілактики та підґрунтям для розробки ефективних методів запобіжного лікування цього тяжкого спадкового захворювання.

Перелік літератури

1. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease // Clin. Genet.— 1974.— 2.— P. 98–118.
2. Emery A. E. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases — a world survey // Neuromuscul. Disord.— 1991.— 1.— P. 19–29.
3. Nelis E., Simokovic S., Timmerman V. et al. Mutation analysis of the connexin 32 (Cx32) gene in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1: identification of five new mutations // Hum. Mutat.— 1997.— N 9.— P. 47–52.
4. Dubourg O., Tardieu S., Birouk N., Gouider R. et al. The frequency of 17p11.2 duplication and Connexin 32 mutations in 282 Charcot-Marie-Tooth families in relation to the mode of inheritance and motor nerve conduction velocity // Neuromuscul. Disord.— 2001.— N 11.— P. 458–6–463.
5. Kim H. J., Hong S. H., Ki C. S. et al. A novel locus for X-linked recessive CMT with deafness and optic neuropathy maps to Xq21.32-q24. // Neurology.— 2005.— N 64 (11).— P. 1964–1967.
6. Ryan M. M., Jones H. R. Jr. CMTX mimicking childhood chronic inflammatory demyelinating neuropathy with tremor // Muscle Nerve.— 2005.— N 4.— P. 528–30.
7. Corcos I. A., Lafreniere R. G., Begy C. R., Loch-Caruso R., Willard H. F., Glover T. W. Refined localization of human connexin32 gene locus, GJB1, to Xq13.1 // Genomics.— 1992.— N 13 (2).— P. 479–480.
8. Sosinsky G. E. Molecular organization of gap junction membrane channels // J Bioenerg Biomembr.— 1996.— N 28 (4).— P. 297–309.
9. Bergoffen J., Scherer S. S., Wang S. et al. Connexin mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease // Science.— 1993.— 262.— P. 2039–2042.
10. <http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>
11. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>
12. Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование. // М.: Мир.— 1985.— 420 с.
13. Wehnert M., Herrmann F. H., Metzke H. et al. Erste ergebnisse bei der genomischen Carrierdiagnostik in Risikostippen mit Haemophilie A und B in der DDR. // Z. gesamte inn. Med.— 1988.— 43, N 16.— P. 441–444.
14. Грищенко Н. В., Бичкова А. М., Пічкур Н. А., Скибан Г. В., Дмитренко В. В., Лівшиць Л. А. Дослідження дуплікації хромосомної області 17p11.2-12 у хворих із спадковою мотосенсорною невропатією типу 1А // Цитология и генетика, — 2003 — 37, № 6. — С. 55–59.
15. Guldberg P., Guttler F. A. simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis // Nucleic Acids Res.— 1993.— 21, N 9.— P. 2261–2262.
16. Takashima H., Nakagawa M., Umehara F. et al. Gap junction protein beta 1 (GJB1) mutations and central nervous system symptoms in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease // Acta Neurol Scand.— 2003.— N107 (1).— P. 31–7.

Представлено В. А. Кунахом
Надійшла 9.11.2006

**ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ
ГЕНА Cx32 В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ
С ДОМИНАНТНЫМ ТИПОМ ШМТ
ИЗ УКРАИНЫ**

*Н. В. Грищенко, А. А. Соловьев,
Д. А. Голомидов, Л. А. Лившиц*

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, Заболотного, 150,
e-mail: livshits@imbg.org.ua

Болезнь Шарко-Мари-Тус (ШМТ) является одной из наиболее распространенных наследственных невропатий, частота которой составляет 1 : 2500. В данной работе представлен анализ мутантных вариантов гена *Cx32* с использованием DGGE для пациентов с аутосомно-доминантной ШМТ1 и членов их семей, у которых не была выявлена ШМТ1А-дупликация. Идентифицирована мутация 65G>A у двух пациентов, у которых выявили измененный DGGE-профиль. Показано, что анализ мутаций в гене *Cx32* с использованием DGGE и последующим секвенированием может эффективно использоваться для скрининга мутаций в гене *Cx32*, ранней дифференциальной диагностики ШМТ1 и генетического консультирования в семьях высокого риска данного заболевания.

Ключевые слова: ШМТХ1, DGGE-анализ, ген *Cx32*.

**CX32 MUTATION VARIANTS ANALYSIS
IN AUTOSOME DOMINANT CMT-FAMILIES
IN UKRAINE**

*N. V. Hryshchenko, O. O. Solovyov,
D. O. Golomidov, I. A. Livshits*

Institute of molecular biology
and genetics NAS of Ukraine,
Ukraine, Kyiv, 150 Zabolotnogo str.,
e-mail: livshits@imbg.org.ua

Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT) is one of the most common hereditary neuropathy, affecting 1 : 2500 individuals. We performed the screening of *Cx32* mutation variants using DGGE for autosome-dominant CMT1 patients without CMT1A-duplication and their relatives. We identified mutation in two aberrant DGGE-probes. It has been shown that DGGE/sequencing analysis of *Cx32* is effective for screening of *Cx32* mutation variants, early differential diagnosis of CMT1 and genetic consulting in high risk families.

Keywords: CMTX1, DGGE-analysis, *Cx32* gene.

УДК. 575.224.4

ЗАЛЕЖНІСТЬ КОНЦЕНТРАЦІЯ — КЛАСТОГЕННИЙ ЕФЕКТ ПРИ ДІЇ МІТОМІЦИНУ С НА КЛІТИНИ ALLIUM SERA L.

В. М. ШКАРУПА, І. Р. БАРИЛЯК

Науковий центр радіаційної медицини АМН України,
Лабораторія мутагенезу та антимутагенезу,
Україна, Київ, вул. Мельникова 53,
тел.: (044) 484-18-74

Показано мутагенний ефект мітоміцину С (МС) на клітинах *Allium sera L.* Встановлена крива доза — кластогенний ефект при концентраціях МС 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 мг/л. Виявлено значно більшу мутагенну ефективність МС щодо клітин *Allium sera* при пролонгованій експозиції з мутагеном у вказаних концентраціях, ніж при більших концентраціях, але меншій експозиції у інших рослинних об'єктів. Максимальний мутагенний ефект ($90,48 \pm 6,4\%$ аберантних клітин) виявлено при концентрації 0,5 мг/л. Показано, що мутагенність МС корелює з пригніченням мітотичної активності. Високий рівень аберантних клітин обумовлюється меншою токсичністю МС при низьких концентраціях, але пролонгованій експозиції, що дозволяє найбільш адекватно оцінити тип залежності мутагенного ефекту від дози.

Ключові слова: хімічний мутагенез, хромосомні аберації, мітотоксичність, мітоміцин С, *Allium sera L.*

Вступ. Мітоміцин С (МС) є біфункціональним алкілюючим антибіотиком, індукує в ДНК декілька типів пошкоджень, зокрема зшивки ДНК-ДНК, які утворюються шляхом алкілювання гуанілових залишків в комплементарних ланцюгах. МС набуває здатності індукувати міжланцюгові зшивки після його активації в клітині шляхом відновлення до гідрохінону за допомогою ферменту типу хінон-редуктази. Необхідність в активації при його дії на ДНК відрізняє МС від більшості алкілюючих сполук [1]. Мутагенність МС була встановлена в досліджах з *E.coli*; для еукаріот також показано, що він пошкоджує молекули ДНК, індукує РЛМ у дрозодфілі, перебудови хромосом в лейкоцитах людини, генні мутації і домінантні леталі у мишей, сестринські хроматидні обміни. Мутагенність МС щодо рослинних організмів була показана для соєвих бобів, *Crepis capilaris*, *Vicia faba* [1–4].

© В. М. ШКАРУПА, І. Р. БАРИЛЯК, 2006

Метою роботи було дослідити залежність кластогенного ефекту на клітинні апікальної меристеми *Allium cepa* L. від концентрації мітоміцину С при пролонгованій експозиції з мутагеном.

Матеріали і методи

Цитогенетичну дію мітоміцину С досліджували за допомогою модифікованого *Allium*-тесту. В якості модельної системи використовували не додаткові корені пророслих цибулин, а кореневу меристему проростків насіння *Allium cepa* L. Для цього насіння цибулі (вік насіння на момент експерименту складав 7 місяців) пророщували в чашках Петрі на зволоженому розчинами мітоміцину С фільтровальному папері в термостаті при температурі +25 °С. Для дослідів використовували наступні концентрації препарату ("Мітоміцин-С Кіова", Японія): 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; мг/л. В якості контролю слугувала дистильована вода.

Для цитогенетичного аналізу відразу після завершення експозиції насіння з мітоміцином С матеріал (корінці довжиною 5–12 мм) фіксували у фіксаторі Кларка (етиловий спирт та оцтова кислота у співвідношенні 3 : 1). Матеріал витримували у фіксаторі при температурі +4 °С не менше 2-х годин. Для мікроскопічного аналізу готували тимчасові давлені препарати, пофарбовані ацетоорсеїном за загальноприйнятими методиками [5]. Проводили мікроскопічне вивчення меристематичної зони корінців. Перебудови хромосом досліджували в ана-телофазі першого поділу меристематичних клітин. В проростках на 72 годину з моменту замочування насіння визначали мітотичний

індекс (MI) та частоту аберантних ана-телофаз (ЧАА) за формулами:

$$MI = \frac{П + М + А + Т}{I + П + А + Т} \cdot 100\%,$$

де П, М, А, Т, I — кількість клітин в стадії профази, метафази, анафази, телофази та інтерфази відповідно.

ЧАА = $n_a \cdot 100\% / n$, де n_a — кількість аберантних ана-телофаз, n — загальна кількість проаналізованих ана-телофаз.

До аберантних відносили анафази, що містили фрагменти і мости як показники кластогенного ефекту. Результати експериментальних даних обробляли за загальноприйнятими статистичними методиками [6].

Результати та обговорення

При дії хімічних мутагенів доза визначається концентрацією речовини і тривалістю контакту з нею. Тому при дослідженні хімічного мутагенезу ефективність впливу визначають або змінюючи концентрацію речовини, або тривалість впливу [7]. Диференційована чутливість фаз клітинного циклу до хімічних мутагенів ускладнює оцінку сили їх впливу. Крім того, в умовах навколишнього середовища найбільш ймовірною є ситуація, коли корені рослин починають розвиватися в умовах вже існуючого забруднення середовища генотоксикантами. Тому ми застосували методику аналізу хромосомних пошкоджень в першому мітотичному циклі за умов пролонгованої дії мутагену на протязі 72 годин від початку замочування насіння до фіксації, так як в стані спокою клітини меристеми *Allium cepa* L. знаходяться переважно в стадії G1 [8]. За даними літератури, МС є досить токсичним, внаслідок чого при

досягненні певного рівня мутацій подальшого їх збільшення не спостерігається. Так, при обробці насіння *Crepis capilaris* протягом 2-х годин у S фазі в концентрації 40 мкг/мл підвищення рівня мутацій порівняно з дією концентрації 20 мкг/мл не виявлено, причому при 40 мкг/мл значна частина насіння не проростала [4]. В клітинах *Bacillus subtilis* дія 1 мкг/мл МС на протязі 5 хвилин викликала в ДНК приблизно 50 міжланцюгових зшивок, що призводило до загибелі клітин [2]. Тому, враховуючи, що експозиція насіння з МС відбувалася на протязі 72 год., використовували менші концентрації мутагену. Результати експериментів представлені в табл. 1.

Як видно з таблиці, в усьому діапазоні досліджених концентрацій МС виявив мутагенний ефект. Вже найменша з досліджуваних доз додала поріг дії мутагену. Максимальний мутагенний

ефект ($90,48 \pm 6,4\%$ аберантних ана-телофаз) виявлено при концентрації 0,5 мг/л. При подальшому збільшенні концентрації в 2 рази відбувається зменшення частоти аберантних ана-телофаз до $84,62 \pm 10,0$. Слід зазначити, що в обох цих випадках кількість досліджених ана-телофаз була дуже малою, внаслідок майже повного пригнічення мітотичної активності при дії мутагену у цих концентраціях. При збільшенні концентрації МС від 0,0005 до 0,2 мг/л спостерігається збільшення кластогенного ефекту мутагену від $3,41 \pm 0,46$ до $83,68 \pm 1,12\%$ аберантних ана-телофаз. При подальшому збільшенні концентрації МС в діапазоні від 0,2 до 0,4 мг/л спостерігається зменшення кількості аберантних клітин, що обумовлюється зростанням токсичності МС. Токсичність різних концентрацій МС добре ілюструється ступенем їх мітотоксичності. Вже при

Таблиця 1. Вплив мітоміцину С на цитогенетичні показники проростків насіння *Allium cepa* L.

Концентрація МС, мг/л	Анафаз	Аберантних	ЧАА \pm Sp, %	Клітин	Мітотичних	МІ, % М \pm m
0	1096	14	$1,28 \pm 0,34$	6640	696	$10,48 \pm 0,38$
1	13	11	$84,62 \pm 10,0^*$	4798	39	$0,81 \pm 0,13^*$
0,5	21	19	$90,48 \pm 6,4^*$	6903	48	$0,69 \pm 0,10^*$
0,4	207	162	$78,26 \pm 2,87^*$	6002	241	$4,02 \pm 0,25^*$
0,3	198	165	$83,33 \pm 2,65^*$	4270	140	$3,28 \pm 0,27^*$
0,2	1091	913	$83,68 \pm 1,12^*$	5551	280	$5,04 \pm 0,29^*$
0,1	1304	805	$61,73 \pm 1,35^*$	6321	398	$6,30 \pm 0,31^*$
0,05	1270	490	$38,58 \pm 1,37^*$	7983	516	$6,46 \pm 0,28^*$
0,025	1460	320	$21,92 \pm 1,08^*$	5325	355	$6,67 \pm 0,34^*$
0,01	1486	227	$15,28 \pm 0,93^*$	7274	448	$7,16 \pm 0,30^*$
0,005	1654	184	$11,12 \pm 0,77^*$	5880	495	$8,42 \pm 0,36^{**}$
0,001	1446	78	$5,39 \pm 0,59^*$	6364	528	$8,30 \pm 0,35^{**}$
0,0005	1584	54	$3,41 \pm 0,46^{**}$	7563	654	$8,65 \pm 0,32^{**}$

Примітка. *P < 0,01; **P < 0,05.

дії найменшої концентрації МС 0,0005 мг/л величина МІ статистично достовірно менша, ніж у контролі. При подальшому зростанні концентрації мутагену МІ зменшується, і при концентраціях 0,5 і 1 мг/л відбувається майже повне пригнічення мітотичної активності (значення МІ 0,69 і 0,81% відповідно).

Була виявлена кореляція між збільшенням аберантних клітин і зменшенням мітотичного індексу при дії МС в діапазоні досліджених концентрацій. Рис. 1 показує взаємозв'язок між впливом МС на частоту аберантних ана-телофаз і мітотичним індексом. Коефіцієнт кореляції дорівнює 0,9 ($P < 0,05$).

Кореляція добре описується лінійним рівнянням: $y = 9,2 - 0,0748x$ (де y – МІ, x – ЧАА). Таким чином, мутагенний ефект МС корелює з пригніченням мітотичної активності.

Найцікавішим виявилось те, що при пролонгованій експозиції з МС мутагенний ефект останнього виявився значно більшим, ніж при більших концентраціях, але невеликій тривалості експозиції. За даними літератури, максимальний мутагенний ефект МС в концентраціях 20 і 40 мкг/мл при експозиції насіння *Crepis capilaris* на протязі 2-х годин у S фазі не перевищував 40,3% аберантних клітин, що автори пояснюють зростанням токсичності мутагену [4]. При обробці проростків деяких трансгенних ліній *Arabidopsis thaliana* мітоміцином С, виявлено лише достовірні зміни інтрахромосомної гомологічної рекомбінації при зростанні концентрації від 5 до 30 мг/л [9]. В досліджах *in vivo* на мишах максимальний ефект при дії МС у концентрації $4 \cdot 10^{-5}$ М (~1,3 мг/л) на протязі 24 годин не перевищував 46,6 % абе-

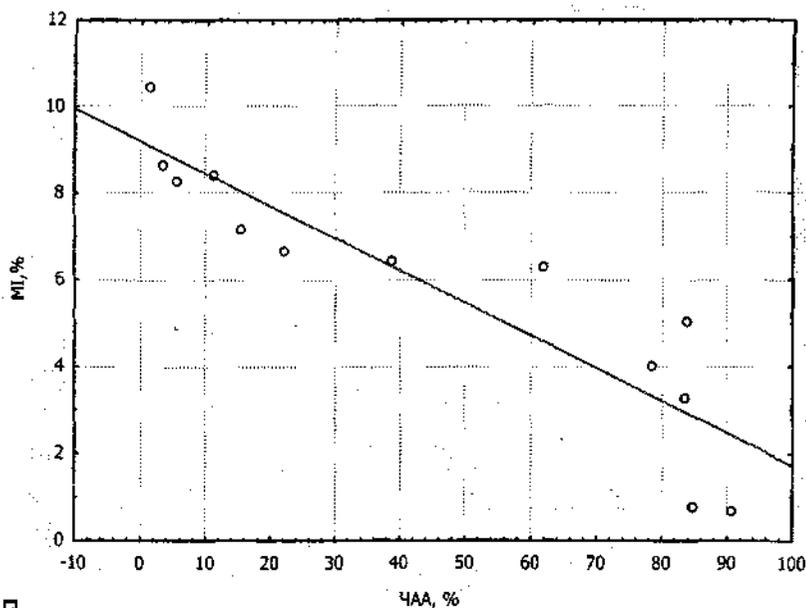


Рисунок 1. Залежність між мітотичним індексом і частотою клітин з абераціями при дії мітоміцину С на клітини *Allium cepa* L.

рантних метафаз [10]. При дії МС в концентрації $0,6 \cdot 10^{-5}$ М на протязі 1 год в культурі лімфоцитів кількість аберантних метафаз досягала 50–55% [7, 11]. Більша мутагенна ефективність МС в досліджах *in vitro* обумовлюється можливо більшою ефективністю антимутагенних механізмів *in vivo*.

Відомо, що при використанні різних алкілюючих сполук в принципі можливо при певних концентраціях досягнути майже 100% рівня аберантних клітин. Це надає можливість детально проаналізувати форму кривих концентраційних залежностей і зробити досить обґрунтовані припущення щодо механізмів дії мутагену. Але не для всіх мутагенів можливо отримати високий рівень аберантних клітин. Поряд з іншим, це обумовлено і цитотоксичністю сполук, що не дозволяє клітинам досягти стадії метафази чи анафази після дії таких речовин [7]. Таким чином, збільшення дози МС не за рахунок концентрації, а за рахунок часу експозиції дозволяє індукувати значно більший рівень мутацій у рослинних організмів і провести більш адекватний аналіз концентраційних залежностей в умовах *in vivo*.

Висновки

1. Встановлена крива доза — кластогенний ефект при пролонгованій (72 год.) дії мітоміцину С в концентраціях: 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 мг/л на клітини апікальної меристеми *Allium cepa* L.

2. Показано, що мутагенна ефективність мітоміцину С в діапазоні досліджених концентрацій статистично достовірно корелює з пригніченням мітотичної активності.

3. Виявлено, що збільшення дози мітоміцину С не за рахунок концентрації, а за рахунок часу експозиції дозволяє індукувати високий рівень мутацій (до $90,48 \pm 6,4\%$ аберантних анателофаз) у рослинних організмів, що дозволить провести більш адекватний аналіз концентраційних залежностей дії мутагену на рослини в умовах *in vivo*.

Перелік літератури

1. Beretta G., Cartei G., Giraldi T., *Mitomycin C. Pharmacology and Clinical Uses.*— Turin: Minerva Medica Publishers.— 1990.— 180 p.
2. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Some naturally occurring substances. 10.— IAFROC. Lyon, 1976.— 354 p.
3. Vig. B. K. Genetic toxicology of mitomycin C, actinomycin, daunomycin and adriamycin.— *Mut. Res.*, 1977.— 39, № 2.— P. 189.
4. Дубинина Л. Г., Курашова З. И. Мутагенез, индуцированный митомцином С // *Генетика.*— 1986 — 22, № 10.— С. 2444–2451.
5. Лаушева З. П. Практикум по цитологии растений.— М.: Агропромиздат.— 1988.— 271 с.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия.— М.: Высшая школа, 1980.— 293 с.
7. Бочков Н. П., Чеботарев А. Н. Наследственность человека и мутагены внешней среды.— М.: Медицина, 1989.— 270 с.
8. Дубинин Н. П., Немцева Л. С. Хромосомные и хроматидные перестройки как результат воздействия радиации на фазу G1 клеток семян *Allium cepa* L. // *Цитология и генетика.*— 1972.— 6, № 2.— С. 99–102.
9. Ковальчук Л. Є., Орел Н. О. Трансгенні рослини як модельний об'єкт для визначення інтенсивності мутагенного фону довкілля // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.*— 2005.— 3, № 1-2.— С. 72–79.

10. Щеглова Е. Г., Чеботарев А. Н. Корреляция уровня сестринских хроматидных обменов и хромосомных aberrаций, индуцированных химическими мутагенами *in vivo* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1983. — № 12. — С. 67–68.
11. Щеглова Е. Г., Чеботарев А. Н. Сопоставление уровня сестринских хроматидных обменов и хромосомных aberrаций, индуцированных химическими мутагенами *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1983. — № 11. — С. 93–95.

Представлено Л. Л. Лукаш
Надійшла 10.08.2006

ЗАВИСИМОСТЬ КОНЦЕНТРАЦИЯ —
КЛАСТОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ПРИ
ДЕЙСТВИИ МИТОМИЦИНА С
НА КЛЕТКИ *ALLIUM CEPA* L.

В. Н. Шкарупа, І. Р. Бариляк

Научный центр радиационной медицины
АМН Украины,
Лаборатория мутагенеза и антимутагенеза,
Украина, г. Киев, ул. Мельникова 53,
тел.: (044) 484-18-74

Показан мутагенный эффект митомицина С (МС) на клетках *Allium cepa* L. Установлена кривая доза — кластогенный эффект при концентрациях МС: 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 мг/л. Выявлена значительно большая мутагенная эффективность МС для *Allium cepa* L. при пролонгированной экспозиции с мутагеном в указанных концентрациях, чем при больших концентрациях, но меньшей экспозиции у других растительных объектов. Максимальный мутагенный эффект ($90,48 \pm 6,4\%$ aberrantных

клеток) выявлен при концентрации 0,5 мг/л. Показано, что мутагенность МС коррелирует с угнетением митотической активности. Высокий уровень aberrantных клеток обуславливается меньшей токсичностью МС при низких концентрациях, но длительной экспозиции, что позволяет наиболее адекватно оценить тип зависимости мутагенного эффекта от дозы.

Ключевые слова: химический мутагенез, хромосомные aberrации, митотоксичность, митомицин С, *Allium cepa* L.

DEPENDENCE CONCENTRATION —
EFFECT AT CLASTOGENIC ACTIVITY
MITOMYCIN C IN CELLS OF *ALLIUM CEPA* L.

V. M. Shkarupa, I. R. Barylak

Research Centre for Radiation Medicine,
AMS of Ukraine,
53 Meinikova str., 04050 Kyiv, Ukraine

The mutagenic effect mitomycin C (MC) on cells *Allium cepa* L is shown. The curve doze-clastogenic effect is erected at concentrations MC: 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1 mg/l. Much greater mutagenic efficiency MC for *Allium cepa* L is revealed, at the prolonged exposure with mutagen in the specified concentrations, than at greater concentrations, but a smaller exposure at other plant objects. The peak mutagenic effect ($90,48 \pm 6,4\%$ aberrations cells) is revealed at concentration of 0,5 mg/l. It is shown, that mutagenicity MC correlates with oppression mitotic activity. The high level aberrations cells is caused by smaller toxicity MC at low concentrations but the long-term exposure that allows to estimate most adequately type of dependence of mutagen effect from a dose.

Key words: chemical mutagenesis, chromosomal aberrations, mitotic toxicity, mitomycin C, *Allium cepa* L.

УДК 575.224.2

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМОВ У АНТАРКТИЧЕСКИХ РЫБ

В. Ф. БЕЗРУКОВ¹, М. Р. ВЕРГОЛЯС², Л. Г. МАНИЛО³

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64,
e-mail: bvf@univ.kiev.ua;

²Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского НАН Украины,
Украина, 03680, Киев, просп. Вернадского, 42,
e-mail: vergolyas@meta.ua;

³Зоологический музей НАН Украины,
Украина, 01033, Киев, ул. Б. Хмельницкого, 15

Изучены цитогенетические показатели нестабильности генома трех видов рыб (Notothenia coriiceps, Trematomus bernacchii и Chaenoccephalus aceratus). Проведен сравнительный анализ видовых особенностей параметров, характеризующих нестабильность генома рыб. Представленные данные могут быть использованы в качестве ориентировочных величин для оценки влияния изменений факторов среды на биоту Антарктической экосистемы.

Ключевые слова: антарктические рыбы, нестабильность генома, ядерные аномалия, эритроциты.

Введение. Антарктические виды рыб являются объектом достаточно интенсивного промысла, и вопросы контроля численности их популяций в настоящее время достаточно актуальны. Кроме того, они являются частью экосистемы, основным свойством которой является повышенная чувствительность к изменению физических и химических параметров среды. Поэтому поиск объективных критериев, по которым можно отслеживать влияние этих факторов на биотические компоненты экосистем, представляет собой задачу важную как в практическом, так и в научном отношении.

Подобным объективным критерием могут быть проявления нестабильности генома — одного из фундаментальных свойств живых организмов. Определенный уровень стабильности генома обеспечивает существование и генетическую целостность вида. Нестабильность гено-

© В. Ф. БЕЗРУКОВ, М. Р. ВЕРГОЛЯС, Л. Г. МАНИЛО, 2006

ма обеспечивает уровень изменчивости, необходимый для адаптивных преобразований и эволюционных изменений вида. Любые изменения среды обитания организмов приведут к изменению устоявшихся условий их развития, что скажется как на их морфологии, так и на особенностях метаболизма. Одним из важных генетических последствий этих изменений будет возрастание неустойчивости генома, результатом которого будет увеличение генетической изменчивости — исходного материала для адаптивной эволюции.

Для характеристики проявлений неустойчивости генома используют достаточно широкий спектр методических подходов. В полевых условиях подходящим источником материала для анализа неустойчивости генома рыб является кровь. Кровь рыб достаточно информативная ткань, которая быстро реагирует на действие различных факторов, ее показатели изменяются в зависимости от условий обитания рыб (температуры, загрязнения, химического состава воды). Так как эритроциты рыб имеют ядра, это позволяет на мазках крови определить частоту микроядер — одного из наиболее часто используемых проявлений неустойчивости генома.

В данном сообщении описаны проявления неустойчивости генома эритроцитов и приведены сведения о частоте встречаемости этих проявлений для трех антарктических видов рыб — нототении, трематомы и белокровки. Вид *Notothenia coriiceps* относится к роду гололобых, или настоящих нототений (*Notothenia*) семейства нототениевых (*Notothenidae*), широко распространен у берегов Антарктиды. К

этому же семейству относится и *Trematomus bernacchii* — трематом пестряк. Данный вид является одним из наиболее многочисленных представителей рода трематомов (*Trematomus*), обитающих в прибрежных водах Антарктиды. Представители этого рода более холодолюбивы, чем нототении, и обитают в крайне суровых условиях. Вид *Chaenocephalus aceratus* — крокодиловая белокровка относится к так называемым белокровным рыбам семейства (*Channichthyidae*). Белокровные рыбы, или белокровки, представляют собой уникальное явление в мировой ихтиофауне, так как у них в живом состоянии кровь не красная, а бесцветная из-за почти полного отсутствия в ней эритроцитов и гемоглобина [2].

Материалы и методы

Исследовали мазки крови трех видов рыб — *Notothenia coriiceps* (135 экземпляров), *Trematomus bernacchii* (20 экземпляров) и *Chaenocephalus aceratus* (10 экземпляров), пойманных во время зимовки 2003–2004 г. в ходе 9-й Украинской Антарктической экспедиции в районе станции “Академик Вернадский” (остров Галиндез, Аргентинские острова, 65° 15' Южной широты, 64° 15' Западной долготы).

Кровь отбирали из хвостовой вены, каплю крови наносили на предварительно обезжиренное предметное стекло. Препараты подсушивали на воздухе, предотвращая попадание пыли, фиксировали в 96%-ном этаноле 30 мин. и снова подсушивали. Фиксированные препараты хранились в сухом месте до проведения цитологи-

ческого анализа. Препараты окрашивали непосредственно перед анализом готовым красителем Мая-Грюнвальда через 3–5 мин. (прибавляют по каплям столько же воды и продолжают окрашивание еще 1 мин.), после чего краситель смывают дистиллированной водой и мазок высушивают на воздухе. На высушенный мазок наливают свежеприготовленный раствор красителя Романовского 2% на 8–15 мин. (в зависимости от температуры в помещении), смывают краску водой и мазок высушивают.

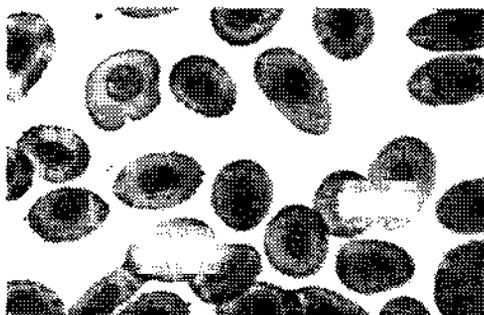
Анализировали ядра эритроцитов, достаточно прокрашенные, расположенные монослоем, не перекрывающие друг друга. Учитывали зрелые эритроциты и только те, в которых четко видны неповрежденные при приготовлении препарата цитоплазма и границы клетки и ядра.

Препараты анализировали под световым микроскопом с увеличением 1000. Общее количество клеток, проанализированных для каждой рыбы, составляло 5000. Статистическая обработка проводилась стандартными методами [4].

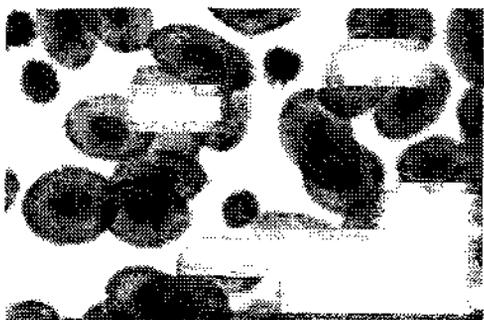
Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены фотографии типичных препаратов трех изученных видов рыб. Эритроциты и другие форменные элементы крови различаются достаточно четко и относительно легко идентифицируются. Эритроциты имеют одно ядро веретеновидной формы, расположенное в центре клетки. На мазках крови крокодиловой белокровки эритроцитов гораздо меньше, чем у двух других видов, что явля-

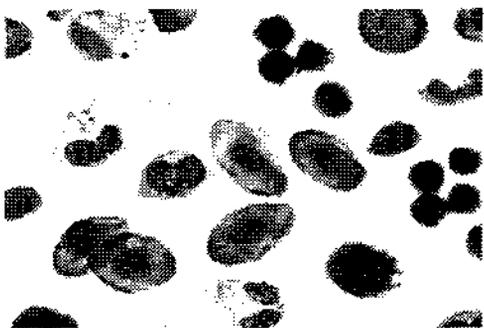
ется ее характерной видовой особенностью. Более детальная характеристика форменных элементов крови и их концентрация в крови этих видов рыб приведена в другой работе [1].



а



б



в

Рисунок 1. Фотографии типичных препаратов мазков крови трех видов антарктических рыб: а — *Notothenia coriiceps*, б — *Trematomus bernacchii* и в — *Chaenocephalus aceratus*

На рисунке 2 показаны эритроциты с нормальными ядрами, с микроядрами и с другими характерными нарушениями морфологии ядра, которые встречались на наших препаратах. Микроядрами считали дополнительные (кроме основного ядра) хроматиновые образования, которые соответствовали общепринятым критериям: округлая форма, размер меньше основного ядра, расположение отдельно от ядра, цвет и структура, аналогичные основному ядру. Микроядра являются общепринятым параметром нестабильности генома, но у рыб, как и у птиц, они встречаются достаточно редко, поэтому в качестве дополнительных параметров, косвенно характеризующих нестабильность генома, нами были использованы различного рода нарушения нормальной морфологии ядер эритроцитов.

Наиболее часто встречались следующие аномалии ядер (рис. 2). Почкующееся ядро (ПЯ) — ядро с перетяжкой, делящей его на две части, одна из которых составляет $1/3-1/4$ общего объема ядра. Двухядерный эритроцит (ДЯ) — эритроцит с двумя ядрами приблизительно равных размеров. Ядро с выемкой (ЯВ) — ядро имеет четкую видимую выемку, края которой не соприкасаются, приблизительно до середины оси. Хвостатое ядро (ХЯ) — один край ядра резко сужен и вытянут. Длина "хвоста" $1/4-1/3$ большего диаметра ядра. Сходные морфологические аномалии были отмечены и у птиц (в том числе и антарктических видов — пингвинов и скуа), у которых, кроме того, встречались эритроциты с двулопастным ядром (ядро с перетяжкой, которая делит его на две приблизительно равные доли). Последствия можно рассматривать как стадию, предшествующую образованию двух ядер [3, 5].

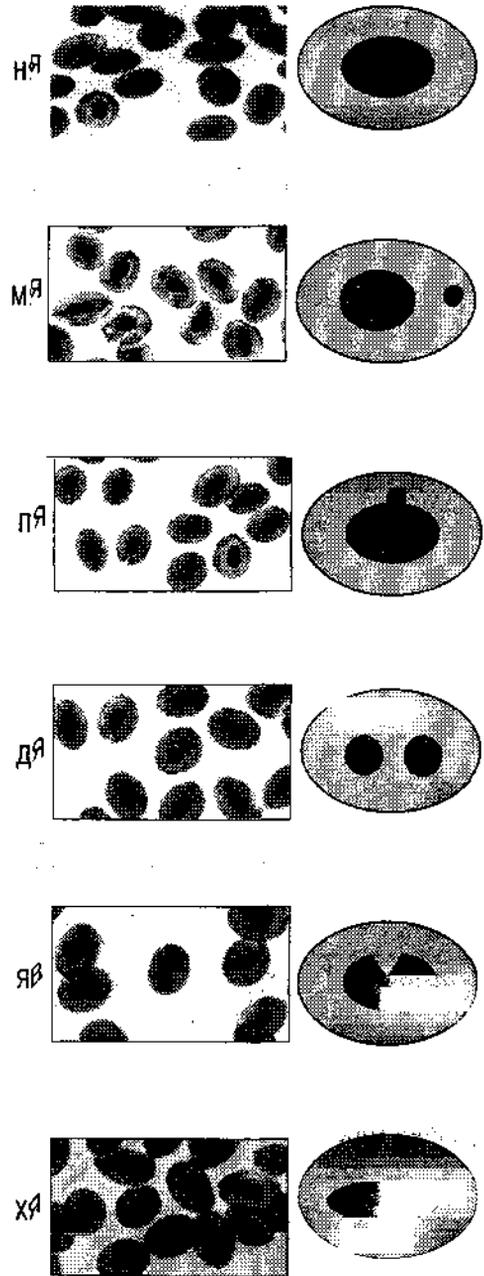


РисунОК 2. Типичные морфологические аномалии ядер эритроцитов изученных видов рыб. НЯ — нормальные ядра, МЯ — микроядра, ПЯ — почкующееся ядро, ДЯ — двухядерный эритроцит, ЯВ — ядро с выемкой и ХЯ — хвостатое ядро

Частоты микроядер и морфологических аномалий ядра у проанализированных нами видов были достаточно близкими (табл. 1). Наименьшая частота микроядер была у *Trematomus bernacchii* ($1,06 \pm 0,06 \text{ ‰}$), наибольшая — у *Chaenocephalus aceratus* ($2,30 \pm 0,13 \text{ ‰}$). У нототении *Notothenia coriiceps* частота микроядер составила $1,17 \pm 0,03 \text{ ‰}$. Из литературы известно, что микроядра в эритроцитах рыб встречаются с частотой $0,14-6,8 \text{ ‰}$ [6]. Данные, полученные нами, находятся в нижней части этой шкалы.

Частота морфологических аномалий ядра была неодинаковой для разных аномалий и вместе с тем достаточно сходной для трех исследованных видов рыб (табл. 1). Наиболее часто встречались ядра с выемкой (ЯВ), среднее значение данного показателя колебалось от $9,40 \pm 0,85 \text{ ‰}$ у *Chaenocephalus aceratus* до $7,08 \pm 0,52 \text{ ‰}$ у *Trematomus bernacchii*. Также достаточно часто встречались почкующиеся ядра (ПЯ) от $6,32 \pm 0,39 \text{ ‰}$ у *Chaeno-*

cephalus aceratus до $4,03 \pm 0,39 \text{ ‰}$ у *Trematomus bernacchii*. Частота встречаемости эритроцитов с двумя ядрами (ДЯ) и хвостатыми ядрами (ХЯ) у антарктических рыб была близкой к частоте встречаемости микроядер (МЯ), от $1,98 \pm 0,39 \text{ ‰}$ (ДЯ) и $2,40 \pm 0,43 \text{ ‰}$ (ХЯ) у *Chaenocephalus aceratus* до $1,05 \pm 0,20 \text{ ‰}$ (ДЯ) и $1,13 \pm 0,21 \text{ ‰}$ (ХЯ) у *Trematomus bernacchii*.

Среди исследуемых видов *Chaenocephalus aceratus* достоверно отличался наивысшим уровнем эритроцитов с какими-либо ядерными нарушениями, за ним следовал вид *Notothenia coriiceps* и далее *Trematomus bernacchii*.

Выводы

Приведенные в данной работе характеристики нестабильности геномов трех антарктических видов рыб могут быть отправной точкой для сравнения популяций этих видов и для оценки влияния на экосистему изменения факторов внешней среды.

Таблица 1. Цитогенетические показатели нестабильности генома эритроцитов периферической крови трех видов рыб (частота, ‰)

Вид	МЯ	ПЯ	ДЯ	ЯВ	ХЯ	Всего
<i>Notothenia coriiceps</i>						
<i>X ± SE</i>	$1,17 \pm 0,03$	$4,78 \pm 0,16$	$1,53 \pm 0,09$	$7,15 \pm 0,20$	$1,69 \pm 0,10$	$16,32 \pm 0,09$
<i>Min — Max</i>	1,14-1,20	4,73-4,83	1,50-1,56	7,09-7,21	1,66-1,72	16,23-16,41
<i>Trematomus bernacchii</i>						
<i>X ± SE</i>	$1,06 \pm 0,06$	$4,03 \pm 0,39$	$1,05 \pm 0,20$	$7,08 \pm 0,52$	$1,13 \pm 0,21$	$14,35 \pm 0,22$
<i>Min — Max</i>	1,00-1,12	3,91-4,15	0,99-1,11	6,92-7,24	1,06-1,20	14,13-14,57
<i>Chaenocephalus aceratus</i>						
<i>X ± SE</i>	$2,30 \pm 0,13$	$6,32 \pm 0,39$	$1,98 \pm 0,39$	$9,40 \pm 0,85$	$2,40 \pm 0,43$	$22,40 \pm 0,37$
<i>Min — Max</i>	2,17-2,43	6,11-6,53	1,86-2,10	9,14-9,66	2,27-2,53	22,03-22,77

Примечание: МЯ — микроядра, ПЯ — почкующиеся ядра, ДЯ — двуядерные эритроциты, ЯВ — ядра с выемкой, ХЯ — хвостатые ядра.

Список литературы

1. Жизнь животных / Ред. Соколов В.Е.— Т. 4.— Рыбы.— М.: Просвещение, 1983.— С. 426–430
2. Лакин Г. Ф. Биометрия.— М.: Высш. шк., 1980.— 293 с.
3. Верголяс М. Р., Безруков В. Ф., Манило Л. Г. Сравнительная характеристика формулы крови антарктических рыб. Факторы экспериментальной эволюции организмов. Збірник наукових праць. Київ, ЛОГОС.— 2006.— 3.— С. 184–188.
4. Курса М. А., Афанасьева Е. С., Рушковский С. Р., Барчук Р. А., Безруков В. Ф., Варенюк И. Н., Блюма О. В. Цитогенетические параметры нестабильности генома птиц в эколого-генетическом мониторинге // Проблемы безопасности атомных электростанций та Чернобиля. Парадигми сучасної радіобіології. Науково-технічний збірник.— 2005.— 3, ч. 2.— С. 92–96.
5. Afanasieva E. S., Rushkovsky S. R., Bezrukov V. F. Parameters of chromosomal instability of *Pygoscelis papua*. Bulg. Antarctic Research. Life sciences.— 2006.— 5.— С. 9–13.
6. Al-Sabti K. Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes.— Joseph Stephane Institute, Ljubljana, Yugoslavia.— 1991.— 222 p.

Представлено С. С. Малютой
Поступила 20.10.2006

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ПРОЯВИ
НЕСТАБІЛЬНОСТІ ГЕНОМІВ
АНТАРКТИЧНИХ РИБ

В. Ф. Безруков¹, М. Р. Верголяс²,
Л. Г. Манило³

¹Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
Україна, 01033, Київ,
вул. Володимирська 64,
e-mail: bvf@univ.kiev.ua;

²Інститут колоїдної хімії і хімії води
ім. А.В. Думанського НАН України,
Україна, 03680, Київ,

пр. Вернадського, 42,
e-mail: vergolyas@meta.ua;
³Зоологічний музей НАН України,
Україна, 01033, Київ,
вул. Б. Хмельницького, 15

Досліджено цитогенетичні прояви нестабільності геному трьох видів риб (*Notothenia coriiceps*, *Trematomus bernacchii* і *Chaenocephalus aceratus*). Проведено порівняльний аналіз видових особливостей відповідних параметрів, які характеризують нестабільність геному риб. Представлені результати можуть слугувати як орієнтовні величини при оцінках впливу зміни факторів середовища на екосистему Антарктики.

Ключові слова: антарктичні риби, нестабільність геному, ядерні аномалія, еритроцити.

CYTOGENETIC MANIFESTATIONS OF
GENOME INSTABILITY OF ANTARCTIC
FISHES

V. F. Bezrukov¹, M. R., Vergolyas²,
L. G. Manilo³

¹National Kyiv University of T. Shevchenko,
Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrska str., 64,
e-mail: bvf@univ.kiev.ua;

²A. V. Dumansky Institute of Colloid Chemistry
and Water Chemistry,
Ukraine, 03680, Kyiv, Vernadskogo blv., 42,
e-mail: vergolyas@meta.ua;

³National museum NASU,
Ukraine, 01033, Kyiv, B. Hmel'nitskogo str., 15

Cytogenetic parameters of genome instability in Antarctic fishes (*Notothenia coriiceps*, *Trematomus bernacchii* і *Chaenocephalus aceratus*) have been studied. Comparative analysis of species-specific peculiarities of these parameters was performed. The presented data may be used as a possibility of use of the complex of cytogenetic parameters in environmental genetic monitoring was estimated. The presented information can be used as points of references for the estimation of environmental changes impact on Antarctic ecosystem.

Key words: Antarctic fishes, instability of genome, nuclear anomaly, erythrocytes.

УДК 579.88:591.557.61:595.771

**СООТНОШЕНИЕ ПОЛОВ
В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ
DROSOPHILA MELANOGASTER УКРАИНЫ**

О. В. ПРОЦЕНКО, О. В. ЖУК, И. А. КОЗЕРЕЦКАЯ

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
Украина, Киев, ул. Владимирская, 64,
e-mail: kozer@univ.kiev.ua

Изучено соотношение полов в восьми природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины и одной популяции Италии. Установлено, что в некоторых популяциях наблюдаются отклонения в соотношениях полов от ожидаемого 1:1. При переводе мух на среду, к которой добавляли антибиотик (тетрациклин), соотношение полов во всех популяциях в первом и последующих поколениях составило 1:1, что может свидетельствовать и о бактериальной природе наблюдаемых отклонений. Посредством ПЦР было установлено наличие 16s рДНК *Wolbachia* в препаратах ДНК особей всех популяций. При введении мух в культуру в течение пяти поколений наблюдалось нерегулярное чередование поколений, в которых соотношение полов составляло либо 1:1, либо количество самок достоверно превышало количество самцов.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, пол.

Вступление. К. Бриджес в 1925 году продемонстрировал, что пол у дрозофилы определяется соотношением количества X хромосом к количеству наборов аутосом [1]. В последнее десятилетие балансовая теория пола была подкреплена открытием молекулярных механизмов определения пола у дрозофилы [2]. Исходя из всех этих данных, пол у дрозофилы рассматривался как менделирующий признак, и соотношение полов в лабораторных и природных популяциях, в отсутствие факторов влияющих на развитие пола, принималось как 1:1. Однако в природе такое распределение полов наблюдалось и наблюдается не всегда. Так С. М. Гершензон в своих работах по изучению природных популяций *Drosophila melanogaster* отмечал, что в потомстве некоторых отловленных в природе особей количество самок резко превышает количество самцов [3]. Он объяснял подобное отклонение от нормального распределения мутационными изменениями у самок.

© О. В. ПРОЦЕНКО, О. В. ЖУК, И. А. КОЗЕРЕЦКАЯ, 2006

С открытием эффектов бактерий *Wolbachia* sp. у различных насекомых, в том числе и у дрозофил, оказалось, что внутриклеточные симбиотические (или паразитические?) бактерии, живущие в цитоплазме различных видов насекомых, управляют половым размножением своего хозяина [4, 5, 6]. Кроме того, известно, что *Wolbachia* может вызывать следующие эффекты: цитоплазматическую несовместимость [7, 8], феминизацию [9], партеногенез [10] и андроцид [11].

Целью данной работы было изучение соотношения самцов и самок в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины, а также динамики этого показателя при переходе к лабораторному разведению. Все изученные природные популяции были протестированы на наличие *Wolbachia* sp.

Материалы и методы

Исследуемый вид. *Drosophila melanogaster* является видом-космополитом, широко представленным в различных уголках Земли, где ей позволяет температурный режим, а также классическим модельным объектом.

Места сбора дрозофил. Выборки из природных популяций *Drosophila melanogaster* собраны на территории Украины в восьми различных локалитетах, в летний сезон (август — сентябрь) 2005 года, а именно в Киеве, Одессе, Лубнах, Пирятине, Умани и Чернобыле. В Киеве и Одессе материал собирали на территории фруктовых садов. Как места с ожидаемой высокой плотностью популяции были выбраны Лубны, Пирятин, Умань, так как в этих городах дрозофил собира-

ли на территории заводов по переработке фруктов. Украина имеет уникальные территории, пережившие Чернобыльскую катастрофу, и вследствие этого характеризующиеся градиентным радиоактивным загрязнением окружающей среды. В исследовании были привлечены три группы особей, собранные в г. Чернобыль и прилегающих к Чернобыльской атомной станции районах (места с уровнем радиационного фона 50 мкР/час, 100 мкР/час и 400 мкР/час соответственно). Как условно контрольная в работу была вовлечена природная популяция г. Болонья (Италия).

Условия лабораторного разведения. Мух в лабораторных условиях размножали в течение пяти поколений на стандартной среде [12], при температуре 25 °С. Для каждого последующего поколения отбирали 30 самок-сиссов родительского поколения. Статистический анализ проводили стандартными методами, для оценки достоверности различий между группами использовали метод χ^2 [13].

Диагностика *Wolbachia* sp. ДНК выделяли из взрослых самок каждой популяции с использованием QIAamp DNA Micro Kit ("Qiagen"). Наличие вольбахии в препаратах ДНК определяли методом ПЦР с использованием праймеров, специфичных к фрагменту длиной 438 п.о 16s rDNA *Wolbachia* (5'CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG, 5'AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC). В качестве положительного контроля использовали праймеры к фрагменту 16s рДНК *D. melanogaster*, для негативного контроля использовалась ДНК лабораторной линии дикого типа *Drosophila virilis*.

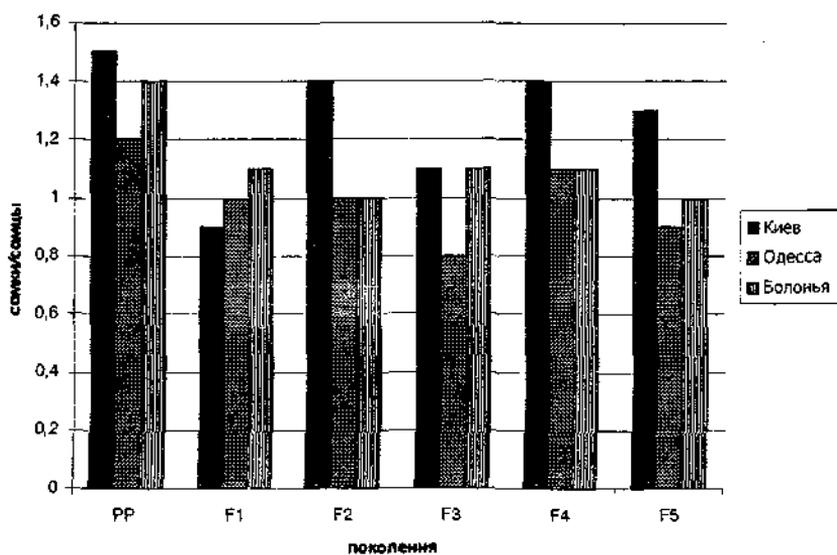


Рисунок 1. Соотношение самцов и самок в родительском поколении и в пяти поколениях дальнейшего лабораторного разведения в популяциях Киева, Одессы, Болоньи

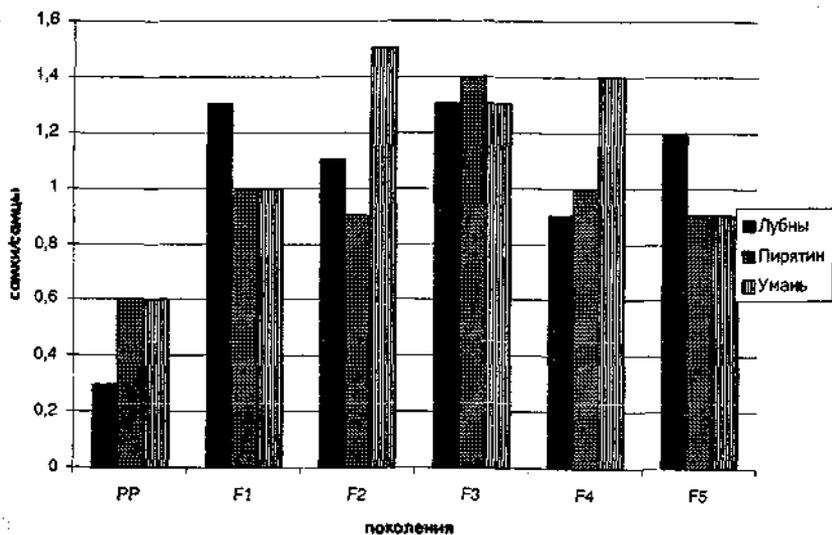


Рисунок 2. Соотношение самцов и самок в родительском поколении и в пяти поколениях дальнейшего лабораторного разведения в популяциях Лубнов, Пирятин, Умани

Соотношение полов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины

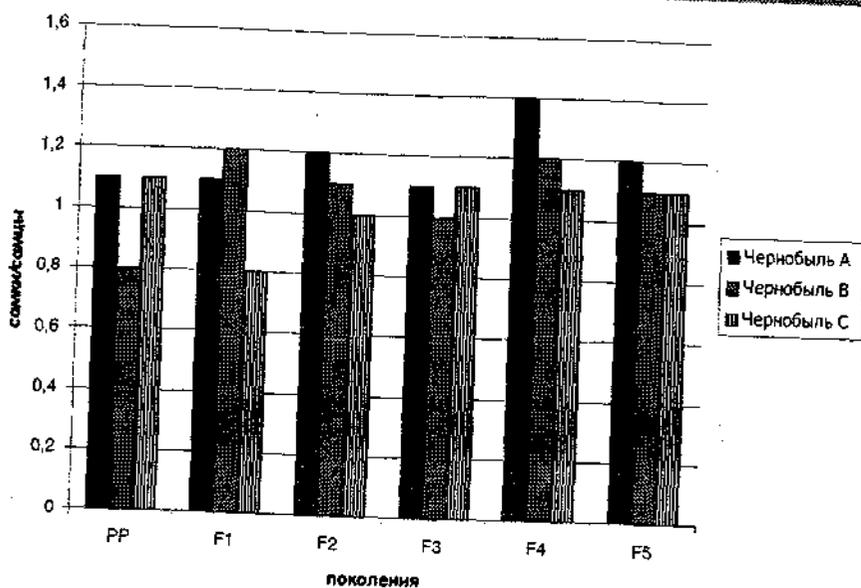


Рисунок 3. Соотношение самцов и самок в родительском поколении и в пяти поколениях дальнейшего лабораторного разведения в популяциях Чернобыля с уровнем радиационного фона 50 мкР/час (А), 100 мкР/час (В) и 400 мкР/час (С)

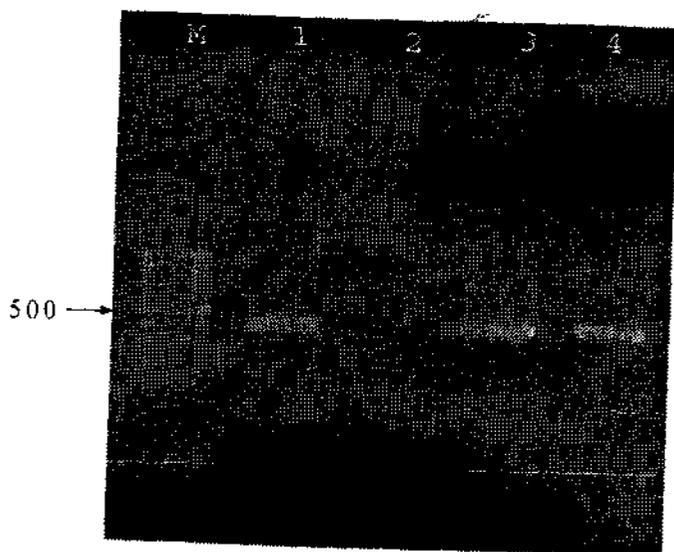


Рисунок 4. Электрофореграмма молекулярно-биологического анализа на наличие *Wolbachia* у *Drosophila melanogaster*. М-маркер молекулярной массы; 1 — фрагмент 16s рДНК *Wolbachia* в ДНК мух популяции г. Киева-437 п.о.; 2 — отсутствие фрагмента 16s рДНК *Wolbachia* в ДНК мух популяции г. Киева, которые развились на тетрациклине; 3 — фрагмент 16s рДНК *Wolbachia* в ДНК мух популяции г. Одессы-437 п.о.; 4 — фрагмент 16s рДНК *Drosophila melanogaster* мух популяции г. Киева-438 п.о. (положительный контроль)

- gaster. // Appl Environ Microbiol.— 2003.— 69, № 3.— P.1428–1434.
17. Montenegro H., Solferini V. N., Klaczko L. B., Hurst G. D. Male-killing Spiroplasma naturally infecting *Drosophila melanogaster*. // Insect Mol. Biol.— 2005.— 14, № 3.— P. 281–287.
18. Gotoh T., Noda H., Ito S. Cardinium symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites. // Heredity.— 2006.— 11.— P. 238–245.

Представлено С. С. Малютою
Надійшла 27. 10. 2006

WOLBACHIA І СПІВВІДНОШЕННЯ СТАТЕЙ
В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ
DROSOPHILA MELANOGASTER УКРАЇНИ

О. В. Проценко, О. В. Жук,
І. А. Козерецька

Київський національний університет імені
Тараса Шевченка
Україна, Київ, вул. Володимирська, 64,
e-mail: kozer@univ.kiev.ua

Вивчено співвідношення статей восьми природних популяцій *Drosophila melanogaster* України і однієї популяції Італії. Встановлено, що в деяких популяціях спостерігаються відхилення у співвідношеннях статей від очікуваного 1:1. При переведенні мух на середовище, до якого додавали антибіотик — тетрациклін співвідношення статей в усіх популяціях в першому та наступних поколіннях стало 1 : 1, що може свідчити і про бактеріальну причину змін у співвідношенні статей. За допомогою ПЛР була встановлена наявність 16s рДНК

Wolbachia в препаратах ДНК особин всіх популяцій. При введенні мух з дев'яти природних популяцій в культуру протягом п'яти поколінь спостерігалось нерегулярне чергування поколінь, в яких співвідношення статей або склало 1:1, або кількість самок достовірно перевищувала кількість самців.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, стать.

WOLBACHIA SP. AND SEX RATIO IN
NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA*
MELANOGASTER IN UKRAINE

O. V. Protsenko, O. V. Zhuk, I. A. Kozeretska

Taras Shevchenko Kyiv National University,
Ukraine, Kyiv, Volodimirska 64,
e-mail: kozer@univ.kiev.ua

The sex ratio of eight natural Ukrainian and one Italian population of *Drosophila melanogaster* was investigated. It was shown that sex ratio had deviation from expected 1 : 1 in some populations. The sex ratio in all generations was 1 : 1 after fruit fly breeding on the medium with antibiotics (tetracycline), which evidence of bacterial causes of visible deviations. The presents of *Wolbachia* 16s rDNA in DNA samples from each populations of fruit fly was found by PCR. After fruit fly natural populations introduction in culture during 5 generations irregular alternation of generation was observed: the sex ratio was either 1 : 1 or number of females significantly exceed the number of males.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *Wolbachia*, sex.

УДК 633.31:631.52

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ ОКРЕМИХ МОРФО-БІОЛОГІЧНИХ ОЗНАК ЛЮЦЕРНИ

В. І. ЯНЧУК, В. С. МАМАЛИГА

Вінницький державний аграрний університет,
Україна, 21008, Вінниця, вул. Сонячна, 3

Вивчено та проаналізовано кореляційні зв'язки між окремими морфологічними та біологічними ознаками люцерни та розкрито їх практичну цінність в селекційній роботі.

Ключові слова: люцерна, морфо-біологічні ознаки, кореляційний зв'язок, міжпопуляційна та внутрішньопопуляційна мінливість.

Вступ. Встановлення кореляційних зв'язків між величиною вегетаційного періоду і тривалістю окремих міжфазних періодів має важливе значення для практичної селекції в плані пошуку методів створення скоростиглих сортів, які б у зоні центрального Лісостепу забезпечували не тільки високу кормову продуктивність, але й могли давати високі врожаї насіння.

Нами було детально вивчено міжпопуляційну та внутрішньопопуляційну мінливість тривалості як самого вегетаційного періоду, так і його складових міжфазних періодів. Розглянуті окремі субознаки, які мають безпосереднє відношення до найбільш мінливого міжфазного періоду — відростання.

Матеріали і методи

Для вивчення залежності між складовими частинами вегетаційного періоду вибрано по одному сорту із різних груп стиглості [1]. До групи ранньостиглих, вегетаційний період яких в середньому за три роки складав 99–104 дні, з 9 сортозразків вибрано Вінничанку селекції Інституту кормів УААН, до групи середньостиглих із тривалістю вегетаційного періоду 108–113 днів з 8 сортозразків — сорт Ярославну селекції Інституту землеробства УААН, до групи пізньостиглих із тривалістю вегетаційного періоду 121–133 дні — сорт *Gulus*.

© В. І. ЯНЧУК, В. С. МАМАЛИГА, 2006

Обліки та спостереження проводили згідно з Методикою державного сортовипробування сільськогосподарських культур [2]. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими статистичними методами [3, 4].

Результати та обговорення

Тривалість вегетаційного періоду в цілому та окремих міжфазних його періодів чітко відрізняється у сортів різних груп стиглості [5].

Представлені на рисунку результати кореляційного аналізу показали, що у скоростиглих сортів досить високий тісний кореляційний зв'язок ($r = 0,79$) існує між довжиною вегетаційного періоду і тривалістю періоду відростання. Менш тісною ($r = 0,46$) була залежність вегетаційного періоду і тривалості міжфазного періоду досягання. Тривалість цвітіння не зв'язана з іншими міжфазними періодами, як і в цілому з періодом вегетації, і не залежала від висоти рослин на період цвітіння.

Висота рослин, інтенсивність відростання і загальна кущистість не мають чітко визначеного зв'язку.

Позитивний зв'язок між тривалістю періоду відростання і висотою травостою був незначний. Це зумовлено тим, що сорт Вінничанка характеризується низькою інтенсивністю відростання, що характерно також і для сортів Йигева-118, N-152 і Elerstaie-1.

У сортів цієї групи скоростиглості, але які мали середній рівень за інтенсивністю відростання, наприклад, Vertus, Mega, рівень зв'язку був значно вищим ($r = 0,45-0,52$).

У сортів середньостиглої групи з періодом вегетації 108–113 днів також

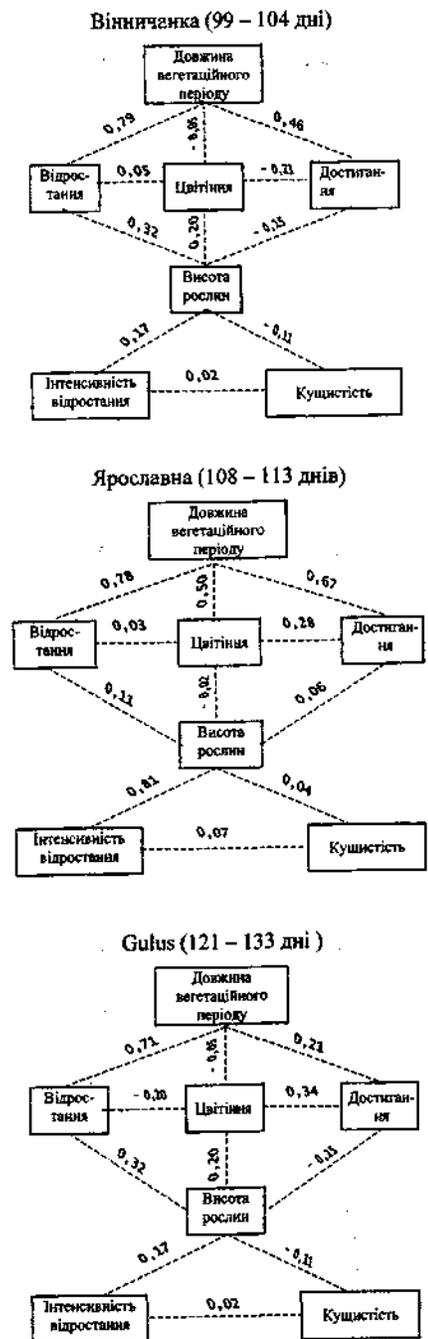


Рисунок. Кореляційні зв'язки між окремими морфо-біологічними ознаками у сорті люцерни з різною довжиною вегетаційного періоду (вказана в дужках)

виявлено тісний зв'язок вегетаційного періоду з відростанням ($r = 0,78$) і середній з тривалістю цвітіння ($r = 0,50$) і досягання ($r = 0,67$).

Досить високий позитивний зв'язок встановлено між інтенсивністю відростання і висотою рослин ($r = 0,81$). В даному випадку це пояснюється тим, що Ярославна відноситься до групи інтенсивно відростаючих сортів (> 40 см). У сортів з середньою інтенсивністю відростання тіснота зв'язку між цими ознаками зменшувалась.

Для цієї групи сортів характерним є посилення кореляційного зв'язку між тривалістю цвітіння і досягання.

Для пізньостиглого сорту, одногодиного представника цієї групи, спостерігали таку ж кореляційну залежність, як і у середньостиглих сортів. Але на відміну від попередніх груп тут мало місце посилення кореляційного зв'язку із загальною куцистістю.

Висновки

Тривалість вегетаційного періоду у люцерни в значній мірі залежить від тривалості міжфазного періоду відростання, який залежить від цілого ряду факторів, зокрема температурного. У двох груп сортів відмічена залежність тривалості вегетації від періоду цвітіння рослин і досягання насіння.

Проведені дослідження показали, що у люцерни існує чітко окреслена міжпопуляційна мінливість сортозразків за такою біологічною ознакою, як тривалість вегетаційного періоду. Всі зразки мають однакову (біля 30 днів) тривалість цвітіння.

Виявлено чіткі міжсортіві відмінності за інтенсивністю відростання і висотою рослин на період укісної стиг-

лості, що відкриває можливості добору рослин за цими ознаками.

Нами не виявлено широких можливостей скорочення міжфазного періоду відростання.

У окремих сортозразків виявлена висока повторюваність тривалості цвітіння і досягання по роках, що свідчить про можливість певного скорочення цих двох міжфазних періодів шляхом застосування інтенсивного добору рослин за цією ознакою.

Перелік літератури

1. Бригс Ф., Ноулз П. Научные основы селекции растений. — М.: Колос, 1972. — 399 с.
2. Методика державного сортопробування сільськогосподарських культур, 2-й випуск (за ред. В.В. Вовкодава). — К.: Альфа, 2001. — 66 с.
3. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
4. Снедекор Дж. У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии / Пер. сангл. — М.: Сельхозгиз, 1961. — 497 с.
5. Бугайов В. Д., Мамалига В. С. Результаты оценки коллекционных образцов люцерны по семенной продуктивности // Тезисы V съезда генетиков и селекционеров. М.: НЦБИ АН СССР, 1987. — IV, ч. 1. — С. 59.

Представлено В. А. Кунахом
Надійшла 1.11.2006

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ОТДЕЛЬНЫХ МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРИЗНАКОВ ЛЮЦЕРНЫ

В. И. Янчук, В. С. Мамалыга

Винницкий государственный аграрный
университет,
Украина, 21008, Винница, ул. Солнечная, 3

Изучено и проанализировано корреляци-
онные связи между отдельными морфоло-
гическими и биологическими признаками
люцерны и раскрыто их практическую цен-
ность в селекционной работе.

Ключевые слова: люцерна, морфо-биоло-
гические признаки, коррелятивная связь,
межпопуляционная и внутривидовая
изменчивость.

THE STATYSIC ANALYSIS OF SOME
MORFO-BIOLOGICAL ALFALFA
PECULARITIES

W. I. Yanchuk, W. S. Mamalyga

Vinnitsa State Agrarien University
Ukraine, 21008, Vinnitsa,
Sonyachna strit, 3

Is studied and is parsed correlation commu-
nications (connections) between separate
morphological and biological tags of an alfalfa
and is uncovered their practical value in selec-
tion activity.

Keywords: alfalfa, morfo-biological tags, corre-
lation communications (connections).

УДК 575.22: 582.923.1 + 576.5

МІНЛИВІСТЬ ЧИСЛА ХРОМОСОМ ТА РІВЕНЬ ХРОМОСОМНИХ АБЕРАЦІЙ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН ТИРЛИЧУ БЕЗСТЕБЛОВОГО (*GENTIANA ACAULIS* L.)

М. О. ТВАРДОВСЬКА¹, Н. М. СТРАШНЮК², В. М. МЕЛЬНИК¹,
В. І. АДОНІН¹, В. А. КУНАХ¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, Київ, вул. Акад. Заболотного, 150,
e-mail: kunakh@imbg.org.ua;

²Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка,
Україна, 46027, Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2,
e-mail: strashniuk@mail.ru

Проведено цитогенетичний аналіз культури тканин *G. acaulis* 11-го та 71-го пасажів та встановлено її міксоплоїдність. Рівень плоїдності клітин у дослідженій культурі варіював від n до $6n$. Виявлено, що з віком культури зростала частка поліплоїдних клітин. Рівень анеуплоїдних клітин був високим і практично не змінювався за умов тривалого культивування. Серед анафазних аберацій хромосом, рівень яких був у межах 2–15%, переважали мости без фрагментів. Ключові слова: *Gentiana acaulis*, культура тканин рослин, цитогенетичні зміни, плоїдність, анафазні аберації.

Вступ. Культивовані *in vitro* клітини та тканини рослин широко застосовують у сучасній біотехнології, зокрема як джерело біологічно активних речовин для отримання лікарської рослинної сировини. Однак, як відомо, адаптація клітин до умов ізольованого росту супроводжується глибокими змінами як генетичної структури клітинних популяцій, так і регуляції метаболічних процесів. Високий рівень гетерогенності і мінливості клітинних популяцій *in vitro* може бути однією з причин значного зниження вмісту вторинних сполук або ж нестабільної продуктивності культур тканин у процесі тривалого вирощування, що описано для багатьох видів рослин [1, 2].

Раніше нами отримано культуру тканин цінного червонокнижного лікарського виду тирличу безстеблого (*Gentiana acaulis* L.), здатну до тривалого росту *in vitro*, а також встановлено її здатність синтезувати фла-

© М. О. ТВАРДОВСЬКА, Н. М. СТРАШНЮК, В. М. МЕЛЬНИК, В. І. АДОНІН, В. А. КУНАХ, 2006

воноїди і ксантони [3]. Молекулярно-генетичні дослідження цієї культури показали, що тривале вирощування клітин в умовах *in vitro* призводить до виникнення різноманітних геномних (а також епігенетичних) порушень [4, 5]. Для цілісної характеристики культури *in vitro*, поряд з молекулярно-генетичними дослідженнями, важливим є проведення цитологічного аналізу.

У даній роботі наведено результати каріотипових досліджень калюсних тканин *G. ascaulis* різної тривалості культивування.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугувала отримана нами культура тканин *G. ascaulis* від рослини, що зростала в Українських Карпатах (гора Туркул, хр. Чорногора).

Калюс вирощували на агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти у темряві при 25 ± 1 °C. Тривалість пасажу складала 4 тижні. Детально умови отримання та вирощування дослідженої культури тканин описано в роботі [6].

Для цитологічного аналізу використовували калюсну тканину в період найвищої мітотичної активності на 7–10 добу культивування 11-го та 71-го пасажів. Зразки фіксували в оцтовому кислотному етанолі (1 : 3) протягом 1 доби. Зафіксований матеріал для зберігання переносили в 70° етанол. Зразки фарбували 1%-им ацетоорсеїном і виготовляли давлені препарати за методикою [7]. Кількість хромосом підраховували у 100 метафазних пластин-

ках. Одночасно визначали типи та кількість анафазних аберацій.

У роботі використовували мікроскоп "NU-2E Carl Zeiss". Мікрофотографування проводили відеокамерою "SAC-410PA Samsung". Отримані дані опрацьовували статистично [8].

Результати та обговорення

Відомо, що число хромосом *G. ascaulis* $2n = 36$ [9; 10]. Проте в літературі відсутні дані цитогенетичних досліджень культури тканин цього виду.

Проведений нами цитогенетичний аналіз калюсних тканин *G. ascaulis* показав значний розмах мінливості кількості хромосом (рис. 1). Для 11-го пасажу він становив 16–107 хромосом з середнім числом на метафазу 34,9, тоді як для цієї ж культури 71-го пасажу — 18–110 з середнім числом на метафазу 56,8 хромосом.

У 11-му пасажі модальний клас формували диплоїдні клітини (30%) та клітини з гіподиплоїдним (36%) і гіпердиплоїдним (18%) наборами хромосом. Більшість клітинної популяції 71-го пасажу становили триплоїдні клітини та клітини з гіпо- і гіпертриплоїдними наборами хромосом, у сумі вони склали 52% (рис. 2).

Таким чином, досліджена культура тканин характеризувалася наявністю поліплоїдних клітин. Їх кількість зростала з тривалістю культивування калюсу. Якщо для 11-го пасажу відсоток таких клітин складав 6%, то 71-го пасажу — 26%. Поряд із поліплоїдними виявлено значну кількість анеуплоїдних клітин, серед яких у 11-му пасажі переважали гіпо- та гіпердиплоїдні клітини, а в калюсі 71-го пасажу — гіпо- та гіпертриплоїдні.

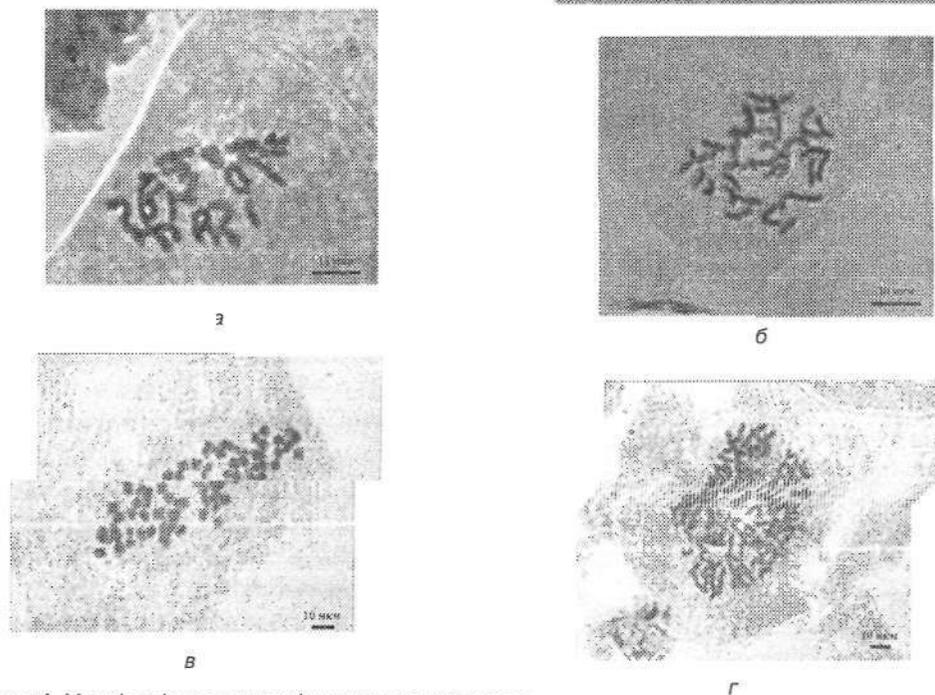


Рисунок 1. Метафазні пластинки з різними числами хромосом: а — 36 хромосом (диплоїд); б — 34 хромосоми (гіподиплсm у клітинах культури тканин *G. ascaulis* ($2n=36$)); в — 72 хромосоми (тетраплоїд); г — 102 хромосоми (гексаплоїд)

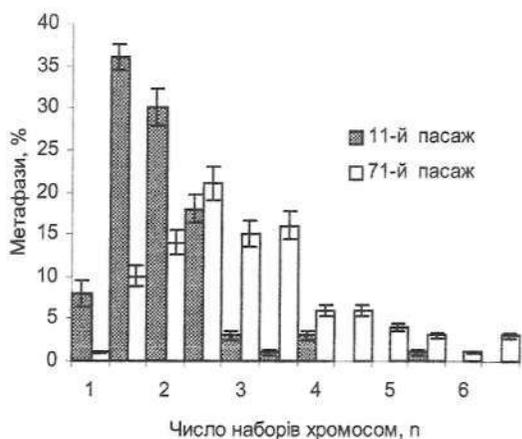


Рисунок 2. Розподіл клітин культури тканин *G. ascaulis* ($2n=36$) за рівнем плоідності в 11-му та 71-му пасажах культивування. У кожному пасажі вивчено по 100 метафаз

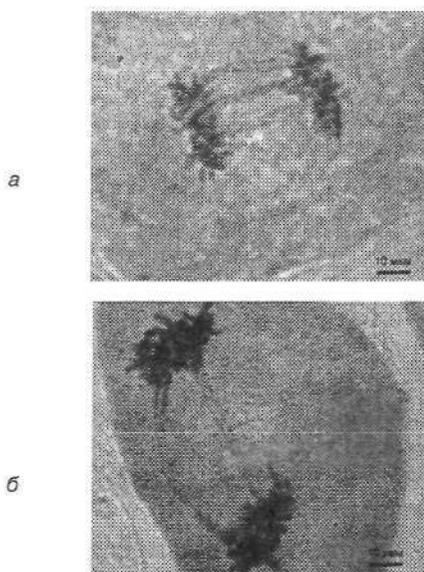


Рисунок 3. Анафазні аберації хромосом в культурі тканин *G. ascaulis*: а — три парних мости; б — два парних мости

Таблиця. Рівень і типи анафазних аберацій хромосом у культурі тканин *G. ascaulis*

Номер пасажу	Кількість вивчених анафаз, шт.	Анафази з абераціями		Типи аберацій					
				одиначні мости		парні мости		комбіновані мости	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
11	43	1	2,3 ± 2,3	1	100	—	—	—	—
71	41	6	14,6 ± 5,5	4	66,6	1	16,7	1	16,7

У культурі тканин тирличу безстеблогового виявлено анафазні аберації хромосом. Їх відсоток був дещо вищим у 71-му пасажі і становив 14,6% (таблиця). Найбільшу кількість серед хромосомних аберацій становили анафази з одиночними мостами, зустрічалися також анафази з парними та комбінованими мостами (рис. 3).

Отже, проведені дослідження свідчать про генетичну гетерогенність клітинних популяцій калюсу *G. ascaulis*. Спектр плоідності клітин у дослідженій культурі тканин варіював від n до $6n$. У 11-му пасажі (перший рік вирощування) високим був відсоток диплоїдних клітин та клітин із біядиплоїдними числами хромосом; у шестирічній культурі (71-й пасаж) їх кількість зменшилася в 1,9 раза. Відсоток поліплоїдних клітин у 71-му пасажі в 4,3 раза перевищував такий у калюсі 11-го пасажу. Збільшення частки поліплоїдних клітин у тривало культивованому калюсі може бути зумовлене як зростанням частоти порушень мітозу, зокрема ендоредуплікацій, так і дією клітинного добору, механізми якого детально розглянуті у книзі [2].

Поряд з поліплоїдією у дослідженій клітинній популяції спостерігали наявність значної кількості анеуплоїдних клітин, відсоток яких із збільшенням тривалості культивування практично не змінювався і становив 56% і 59% в 11-му та 71-му пасажах, відповідно. При цьо-

му частка гіпердиплоїдних клітин була майже однаковою, а кількість гіпертриплоїдних клітин у тривало культивованому калюсі зросла на 15%.

Нами встановлено тенденцію до зростання кількості структурних перебудов хромосом у культурі тканин *G. ascaulis* із збільшенням тривалості вирощування. Слід зазначити, що усі виявлені аберації були у вигляді мостів без фрагментів. Наявність такого типу перебудов може бути результатом різних механізмів, головним з яких є збереження в клітинних поколіннях дицентричних хромосом внаслідок циклу мостів "розрив — злиття — міст" [2].

Таким чином, вирощування калюсних тканин тирличу безстеблогового в умовах *in vitro* призводить до цитогенетичної варіабельності, що проявляється у міксоплоїдності клітинних популяцій. Аналогічні результати отримані при аналізі калюсу іншого виду тирличів *Gentiana scabra*, у якому поряд із диплоїдними ($2n = 26$) виявлено анеуплоїдні та тетраплоїдні клітини [11].

Нами встановлена залежність цитогенетичних змін, зокрема кількості поліплоїдних клітин, у культурі тканин *G. ascaulis* від тривалості культивування. Це узгоджується з літературними даними про збільшення частоти і ступеня каріотипових порушень при тривалому вирощуванні клітин *in vitro* багатьох інших видів рослин [2, 12–15]. При

цьому показано, що швидкість появи каріотипів із зміненим числом хромосом в клітинах залежить від виду рослини та її генотипу [2, 16]. Цікавою особливістю дослідженої нами культури тканин *G. acaulis* було те, що високий відсоток анеуплоїдних клітин спостерігався вже в 11-му пасажі і залишався практично незмінним у процесі тривалого вирощування до 71-го пасажу.

Висновки

Проведено цитогенетичний аналіз калюсних тканин тирличу безстеблового ($2n = 36$) різної тривалості культивування. Виявлено значний розмах мінливості за числом хромосом як в 11-му, так і в 71-му пасажах: 16–107 та 18–110 хромосом, відповідно. Встановлено, що в 11-му пасажі (однорічна культура тканин) модальним класом були клітини з диплоїдним та біядиплоїдним наборами хромосом, а в 71-му (шестирічна культура) — клітини з триплоїдним та біятриплоїдним наборами. У 6-річній культурі, порівняно з однорічною, виявлено зростання кількості поліплоїдних клітин у 4,3 раза, відсоток анеуплоїдних клітин практично не змінився. Серед анафазних аберацій хромосом, рівень яких був у межах 2–15%, переважали одиночні мости без фрагментів.

Перелік літератури

1. Носов А. М. Культура клеток высших растений — уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. — 1999. — 46, № 6. — С. 837–844.
2. Кунах В. А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005 — 730с.
3. Страшнюк Н. М., Леськова О. М., Мельник В. М., Кунах В. А. Отримання та

біохімічний аналіз культури тканин тирличу безстеблового (*Gentiana acaulis* L.) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — 4, № 1. — С. 89–95.

4. Андреев І. О., Спіридонова К. В., Мельник В. М., Кунах В. А. Міжвидовий поліморфізм та зміни в культурі *in vitro* генів 5S рРНК у представників роду Тирлич (*Gentiana* L.) // Доповіді НАН України. — 2004. — № 6. — С. 189–192.
5. Мельник В. М., Андреев І. О., Спіридонова К. В., Страшнюк Н. М., Кунах В. А. Зміни 18S-25S рДНК у культурі тканин деяких видів тирличів *Gentiana* L. // Цитология і генетика. — 2007. — 41, № 2. — С. 19–23.
6. Страшнюк Н. М., Грицак Л. Р., Леськова О. М., Мельник В. М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — 36, № 4. — С. 327–334.
7. Кунах В. А., Левенко Б. А. Модификация метода давлених препаратів для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // Цитология и генетика. — 1975. — 9, № 1. — С. 56–60.
8. Плохинский Н. А. Биометрия. Издание 2-е. — М.: Изд-во МГУ. — 1970. — 367 с.
9. Болховских З. В., Гриф В. Г., Захарьева О. И., Матвеева Т. С. и др. Хромосомные числа цветковых растений. — Л.: Наука, 1969. — С. 328–330.
10. Mededovic S., Sijak-Yakovlev S., Misic L. Comparative biosystematic study on the *Gentiana acaulis* L. and *Gentiana dinarica* Beck Species. // God. Biol. Inst. Univ. Sarajevo. — 1984. — 37. — P. 79–90.
11. Lee M.-K., Bang J.-W., Lee H.-K. Chromosome stability in the cultured cells and the regenerated plants of *Gentiana scabra* var. *buergeri* // Chromosome Research. — 1995. — 3, Suppl. 1. — P. 116.
12. Gonsales A. I., Pelaez M. I., Ruiz M. L. Cytogenetic variation in somatic tissue cultures and regenerated plants of barley // Euphytica. — 1996. — 91, № 1. — P. 37–43.
13. Mukhrjee A., Debata B. K., Naskar S.K. Cytology of callus and regenerated plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) // Cyto-bios. — 1998. — 96, № 382. — P. 109–118.

14. Чугункова Т. В., Дубровная О. В. Цитогенетический анализ каллусных культур и растений-регенерантов, полученных из эксплантов сахарной свеклы различной пloidности // Цитология и генетика.— 1998.— 32, № 4.— С. 9–15.
15. Brar D. S., Jain S. M. Somaclonal Variation: mechanism and applications in crop improvement // Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement.— 1998.— Kluwer Academic Publishers Dordrecht Printed in Great Britain.— P. 15–37.
16. Козыренко М. М., Артюкова Е. В., Лауве Л. С. и др. Генетическая изменчивость каллусных линий женьшеня *Panax ginseng* // Биотехнология.— 2001.— № 1.— С. 19–26.

Представлено С. С. Малютою
Надійшла 29.10.2006

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЧИСЛА ХРОМОСОМ
И УРОВЕНЬ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ
В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ ГОРЕЧАВКИ
БЕССТЕБЕЛЬНОЙ (*GENTIANA ACAULIS* L.)**

М. О. Твардовская¹, Н. М. Страшнюк²,
В. Н. Мельник¹, В. И. Адонин¹, В. А. Кунах¹

¹Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, Киев,

ул. Акад. Заболотного, 150,
e-mail: kunakh@imbg.org.ua;

²Тернопольский национальный
педагогический университет
имени Владимира Гнатюка,
Украина, 46027, Тернополь,
ул. М. Кривоноса, 2,
e-mail: strashniuk@mail.ru

Проведен цитогенетический анализ культуры тканей *G. acaulis* 11-го и 71-го пассажей и установлена её миксопloidность. Уровень пloidности клеток в исследован-

ной культуре варьировал от n до $6n$. С возрастом культуры увеличивалось количество полипloidных клеток. Уровень анеупloidных клеток был высоким и практически не изменялся в условиях продолжительного культивирования. Среди анафазных абераций хромосом, уровень которых находился в пределах (2–15%), преобладали мосты без фрагментов.

Ключевые слова: *Gentiana acaulis*, культура тканей растений, цитогенетические изменения, пloidность, анафазные аберации.

**CHROMOSOME NUMBER VARIABILITY
AND CHROMOSOME ABERRATION LEVEL
IN *GENTIANA ACAULIS* L. TISSUE CULTURE**

M. O. Twardovska¹, N. M. Strashniuk²,
V. M. Mel'nyk¹, V. I. Adonin¹, V. A. Kunakh¹

¹Institute of Molecular Biology
and Genetics, NAS of Ukraine,
Ukraine, 03143,
Kyiv, Acad. Zabolotnogo str., 150,
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

²Ternopil' National Volodymyr Hnatiuk
Pedagogical University,
Ukraine, 46027, Ternopil',
M. Kryvonosa str., 2,
e-mail: strashniuk@mail.ru

Cytogenetic analysis of *G. acaulis* tissue culture from 11-th and 71-st passages has been carried out to find its mixoploidy. Cell ploidy level in the tissue culture involved varied between n and $6n$. It was established that as the culture age rose there increased the proportion of the polyploid cells. Aneuploid cell level in callus was high and practically failed to change under conditions of long-term culturing. Among the anaphase chromosome aberrations, whose levels varied within 2–15%, prevailed bridges without fragments. **Key words:** *Gentiana acaulis*, plant tissue culture, cytological changes, ploidy, anaphase aberrations.

УДК 576.53: 581.143.6

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСІВ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ В КУЛЬТУРІ ТКАНИН РАУВОЛЬФІЇ ЗМІІНОЇ *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH

І. Ю. ПАРНИКОЗА¹, Н. Ю. МІРЮТА², Ю. АЛ-АММУРІ², В. І. АДОНІН²,
В. А. КУНАХ²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Україна, 01033, Київ, вул. Володимирська, 64,
e-mail: Parnikoza@gmail.com

² Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03143, Київ, вул. Акад. Заболотного, 150,
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

*Методом парної лінійної регресії виявлено опосередкований зв'язок процесів проліферації та диференціації у клітинній лінії K-27 (5C) *R. serpentina* – продуцента індолінових алкалоїдів. Амітотична проліферація пов'язана з утворенням трахеїдних елементів, яка в свою чергу пов'язана з накопиченням сухої біомаси. Динаміка мітотичної проліферації має зв'язок з динамікою накопичення індолінових алкалоїдів.*

*Ключові слова: *Rauwolfia serpentina*, проліферація, диференціація, культура тканин рослин, клітинні лінії – продуценти алкалоїдів.*

Вступ. У наш час біомаса культури клітин та тканин *in vitro* здатна замінити натуральну сировину цінних, рідкісних та зникаючих рослин. При цьому важливим є контрольованість виходу вторинних метаболітів у певного клітинного штаму-продуцента та можливість спрямованого впливу на підвищення його продуктивності. Накопичення вторинних метаболітів та сухої біомаси є основними біотехнологічними параметрами таких штамів. Ці показники, що зветься макропараметрами, характеризують процеси диференціації клітин *in vitro*.

Метою даної роботи було вивчити можливий зв'язок динаміки макропараметрів та деяких інших показників, що характеризують диференціацію клітин, з динамікою проліферативних процесів у культурі тканин тропічної лікарської рослини раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* Benth. — джерела цінних індолінових алкалоїдів, зокрема протиаритмічного алкалоїду аймаліну.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугувала високопродуктивна клітинна лінія K-27 (5C) *R. serpentina*, генеалогія та особливості якої описано в роботі [1]. Протягом пасажу цієї лінії в стандартних умовах на 0, 10, 20, 30 та 40-ву добу росту відбирали проби для визначення приросту сухої біомаси та вмісту індолінових алкалоїдів за стандартною методикою (див. [1]). На базі отриманих даних будували пасажні криві динаміки відповідних макропараметрів. Паралельно о 10 годині кожної доби відбирали шматочки калюсу вагою до 1 г для цитологічного аналізу, які фіксували в оцтовокислому спирті (1:3) та через добу переносили у 70% етанол. Як показники проліферації вивчали пасажну динаміку мітотичної та амітотичної активності. Для визначення цих показників матеріал фарбували ацетоорсеїном та готували давлені препарати. Аналізували по п'ять тисяч клітин у кожній точці на чотирьох різних препаратах. Одночасно на цих же препаратах досліджували динаміку одного з процесів диференціації — кількість трахеїдних елементів. На основі отриманих даних будували криві динаміки відповідних цитологічних показників.

Для вивчення ще одного показника диференціювання клітин — відносного вмісту ДНК (ВВДНК) матеріал фарбували за Фольгеном за [2]. Для денситометрії застосовували оптичну систему, що складалася з зеленого світлофільтра мікроскопа NU-2E (Carl Zeiss), червоного світлофільтра цифрової камери CCD Sac-410 PA, відеодрайвера Asus V 3000. Вимірювання щільності засвітки в пікселях проводили на циф-

рових фотографіях відносно забарвленої за Фольгеном анафази в програмі Scion Image. Таким чином отримували показник ВВДНК. За показниками ВВДНК клітини розбивали на окремі класи, для кожного з яких будували криві їх пасажної динаміки. Одержані криві динаміки цитологічних процесів, класів за ВВДНК та макропараметрів порівнювали між собою методом парної лінійної регресії за [3].

Результати та обговорення

У дослідженої клітинної лінії K-27 (5C) *R. serpentina* спостерігали два механізми проліферації клітин — мітотичні та амітотичні поділи. Другий шлях поділу добре відомий для культури тканин *R. serpentina* [4], описаний він і для культур тканин деяких інших видів рослин [4, 5].

Було встановлено, що у лінії K-27 (5C) *R. serpentina* впродовж усього пасажу кількість амітозів перевищувала кількість мітозів (рис. 1). Частота амітотичних поділів особливо зростала в другій половині пасажу, коли в культурі тканин відбуваються процеси інтенсивного накопичення алкалоїдів. Можна припустити, що це є особливістю тривалокультивованих, високопродуктивних, а відповідно — високодиференційованих штамів-продуцентів, оскільки подібне явище встановлено і для інших високопродуктивних клітинних ліній, зокрема для лінії AE-3 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. — джерела нафтохінонового пігменту шиконіну [6].

У першій половині пасажу (1–20-та доба росту) спостерігали переважно амітотичні поділи, при яких каріотомія не супроводжувалася одночасною ци-

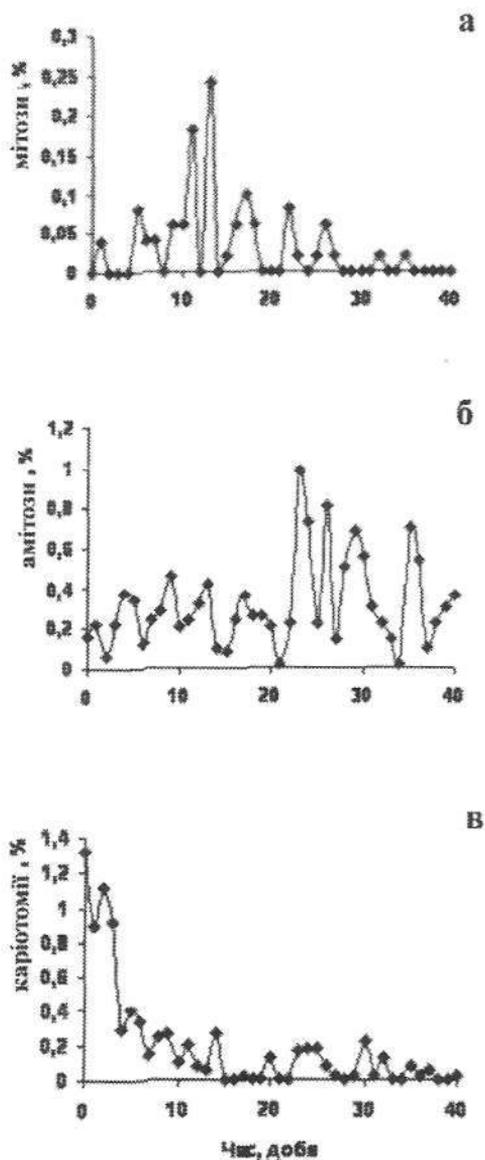


Рисунок 1. Динаміка проліферативних процесів протягом пасажу у культурі тканин *R. serpentina*, клітинна лінія К-27 (5С): а — кількість мітозів, б — амітозів, в — каріотомії без одночасної цитотомії

тотомією (рис. 2а). При цьому спостерігали двоядерні клітини, значного накопичення яких не виявлено (рис. 2б). Це, можливо, означає, що більшість таких клітин через деякий час ділилися. Амітотичні поділи з одночасним проходженням каріо- та цитотомії спостерігали впродовж усього пасажу, але їх кількість помітно зростала з наближенням до кінця пасажу (рис. 1б).

Нашу увагу привернули послідовні картини повного амітотичного поділу, коли внаслідок поділу ядра перетяжкою в дочірніх клітинах утворювались клітини з веретенovidними ядрами. Зазви-

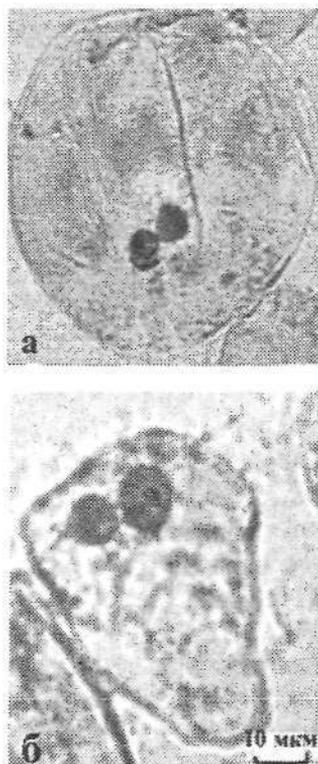


Рисунок 2. Каріотомія без одночасної побудови фрагмопласту (а), та клітина, яка може бути результатом каріотомії без одночасної побудови фрагмопласту (б) в клітинній лінії К-27 (5С) *R. serpentina*

чай клітини, що утворювалися очевидно внаслідок послідовних амітотичних поділів (своєрідної нарізки), лежали стопками. При цьому з одного кінця знаходилися клітини з добре помітними ядрами, а з іншого — готові трахеїдні елементи. Між ними знаходилися клітини, подібні до тих, які описали інші дослідники на прикладі *Zinnia elegans* L. та трактувалися як стадії апоптозу [7]. На рис. 3 ми зробили спробу реконструю-

вати послідовність перебігу цього процесу на основі окремих стадій, які спостерігали під час цитологічного аналізу.

З метою пошуку можливого зв'язку між описаними проліфераційними механізмами та біотехнологічними показниками-макропараметрами у клітинній лінії K-27 (5C) *R. serpentina* вивчали питому швидкість накопичення сухої біомаси та індолінових алкалоїдів, як описано у роботі [8].

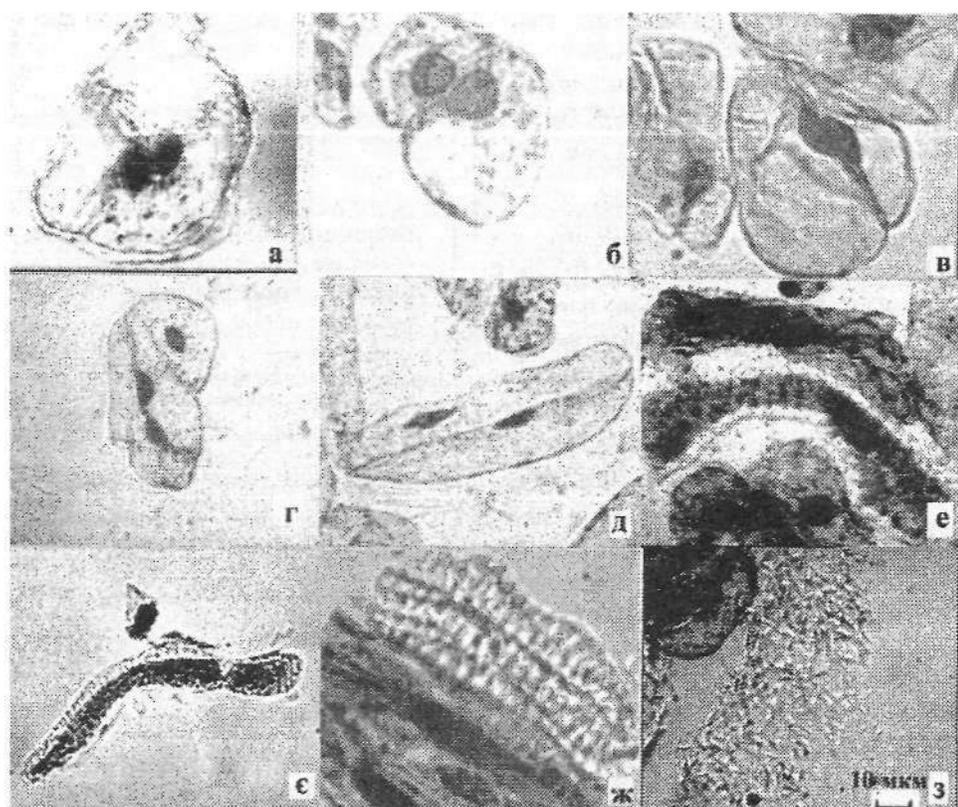


Рисунок 3. Реконструкція вірогідних послідовних стадій утворення трахеїдного елемента в клітинній лінії K-27 (5C) *R. serpentina*:

а — поділ ядра борозною, початок побудови фрагмопласта; б — продовження побудови фрагмопласта та поділ ядра перешнutoвкою; в — продовження побудови фрагмопласта; г — розходження двох веретеновидних ядер по фрагмопласту; д — дві дочірні видовжені клітини з веретеновидними ядрами; е — формування трахеїдного елемента з видовженої клітини з веретеновидним ядром — спіральне потовщення клітинної стінки та початок лізису вмісту клітини; е — лізис вмісту клітини; ж — сформований трахеїдний елемент; з — деградація трахеїдного елемента

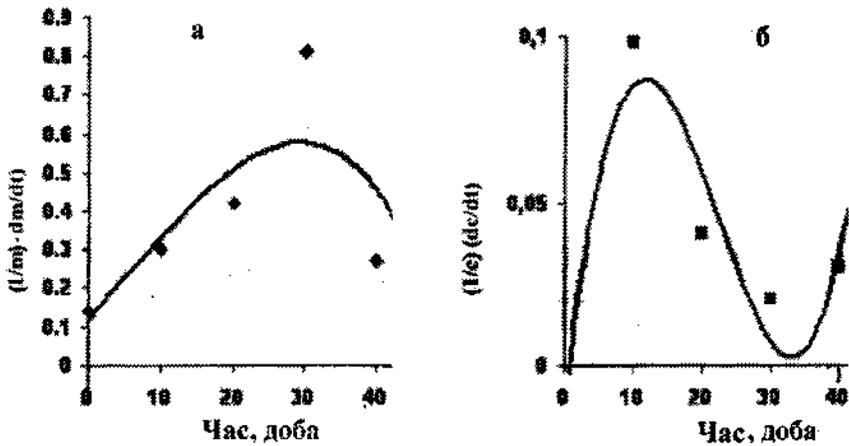


Рисунок 4. Динаміка питомої швидкості накопичення сухої біомаси (а) та індолінових алкалоїдів (б) у клітинній лінії К-27 (5С) *R. serpentina* впродовж пасажу

Було виявлено, що крива питомої швидкості накопичення сухої біомаси має вигляд параболи з максимумом на 30-ту добу (рис. 4а). Динаміка питомої швидкості накопичення індолінових алкалоїдів впродовж пасажу описується однією складовою — параолою з максимумом на 12-ту добу (рис. 4б).

Впродовж пасажу аналізували також кількість трахеїдних елементів, що характеризує інтенсивність перебігу одного з напрямків диференціації. Спостерігали значні коливання цього показника (рис. 5а). Вище зазначалося, що клітини попередниці трахеїдних елементів можуть утворюватися амітотично.

Враховуючи результати візуальних спостережень, ми намагалися виявити клас клітин-попередниць трахеїдних елементів. Для цього криву їх динаміки порівнювали з динамікою класів клітин з різним відносним вмістом ДНК в ядрі. Дані щодо розмірних меж класів за цим показником та їх сумарної пасажної частки подано в таблиці.

Таблиця. Розмірні межі та сумарна пасажна частка класів клітин за відносним вмістом ДНК в ядрі клітинної лінії К-27(5С) *Rauwolfia serpentina*

Номер класу	Межі класу за відносним вмістом ДНК	Частка класу в популяції, %
1	<1	1,59
2	1-2,99	60,05
3	3-4,99	30,63
4	5-6,99	6,32
5	7-8,99	1,22
6	9-10,99	0,17
7	>11	0,02

Виявили позитивний кореляційний зв'язок динаміки трахеїдних елементів та динаміки кількості клітин з ВВДНК 1-2.99 С ($R = +0,75$, рис. 5б). В той же час динаміка саме цього класу клітин позитивно корелює з динамікою питомої швидкості накопичення сухої біомаси ($R = +0,8$). Таким чином простежується зв'язок утворених амітотично клітин-попередниць

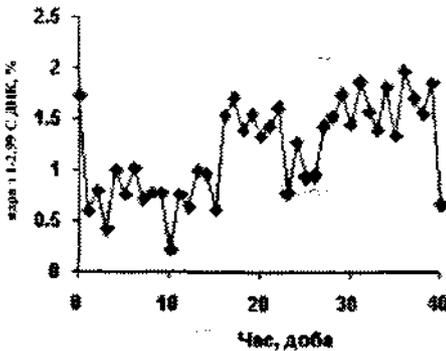
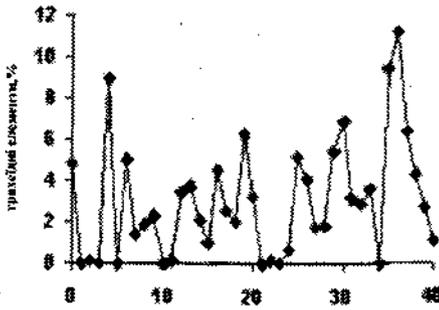


Рисунок 5. Динаміка кількості трахеїдних елементів (а) та кількості ядер з відносним вмістом ДНК 1-2.99 С (б) впродовж пасажу клітинної лінії K-27 (5C) *R. serpentina*. Виявлено позитивну кореляцію між кривими а та б при $R = +0,44$

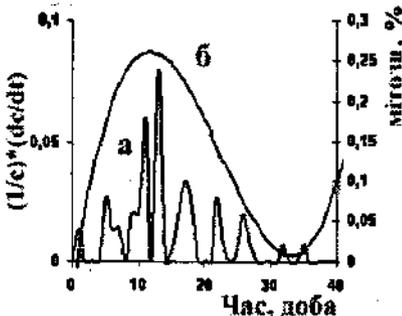


Рисунок 6. Динаміка кількості мітозів (а) та питомої швидкості накопичення індолінових алкалоїдів (б) впродовж пасажу клітинної лінії K-27 (5C) *R. serpentina*. Виявлено позитивну кореляцію між кривими а та б при $R = +0,44$

трахеїдних елементів з накопиченням сухої біомаси. З динамікою ж питомої швидкості накопичення індолінових алкалоїдів цей клас клітин виявляє негативну кореляцію ($R = -0,58$).

На відміну від амітотичної, динаміка мітотичної проліферації має позитивний кореляційний зв'язок з динамікою питомої швидкості накопичення індолінових алкалоїдів (рис. 6, $R = +0,48$).

Висновки

1. У клітинній лінії K-27 (5C) *R. serpentina* виявлено два механізми проліферації: мітотичні та амітотичні поділи клітин.

2. Реконструйовано вірогідну послідовність стадій утворення клітин-попередниць трахеїдних елементів шляхом амітотичної проліферації, рівень якої впродовж усього пасажу залишався вищим за мітотичну і зростав у другій половині пасажу.

3. Виявлено клас клітин з відносним вмістом ДНК 1-2.99 С, частина якого може бути клітинами-попередниками трахеїдних елементів. Динаміка цього класу клітин має позитивний кореляційний зв'язок з динамікою питомої швидкості накопичення сухої біомаси та негативний з динамікою питомої швидкості накопичення індолінових алкалоїдів.

4. Динаміка мітотичної проліферації має позитивний кореляційний зв'язок з динамікою питомої швидкості накопичення індолінових алкалоїдів.

Перелік літератури

1. Кунах В. А., Аль-Аммури Ю., Мирюта Н. Ю., Можилевская Л. П. Накопление индоллиновых алкалоидов клеточными линиями раувольфии змеиной при по-

- верхностном и глубинном выращивании // Биополимеры и клетка.— 2006.— 22, № 2.— С. 149–156.
2. *Histological Histochemical Methods. Theory and Practice. Second edition* by J.A. Kiernon — Pergamon Press.— 1990.— P. 136–364.
 3. *Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики*. М.: Финансы и статистика.— 1982.— 344 с.
 4. *Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи*.— К.: Логос.— 2005.— 730 с.
 5. *D'Amato F. D. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell culture. // Applied and fundamental aspects of plant cells, tissue and organ culture. // Edit. Reinert J. Bajaj. J. P. S — Berlin etc.: Springer-Verlag.— 1977.— P. 343–356.*
 6. *Парнікоза І. Ю., Адонін В. І., Мірюта Н. Ю., Пороннік О. О., Кунах В. А. Зв'язок між процесами диференціації та проліферації в культурі тканин *Arnebia euchroma* (Royle.) Jonst. // 36. наукових праць "Фактори експериментальної еволюції організмів".— Київ: Аграрна наука.— 2003, С. 327–333.*
 7. *Groover A., Jones A. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis // Plant Physiology.— 1999.— V. 119.— P. 375–384.*
 8. *Мірюта Н. Ю., Парнікоза І. Ю., Аль-Аммурі Ю., Кунах В. А. Применение термодинамического подхода для изучения динамики клеточных популяций in vitro на примере культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth.— продуцента индолиновых алкалоидов// Биотехнология.— 2006.— № 2.— С. 78–95.*

Представлено С. С. Малютою
Надійшла 27.10.2006

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССОВ
ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ РАУВОЛЬФИИ
ЗМЕИНОЙ *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH.

И. Ю. Парнікоза¹, Н. Ю. Мірюта²,
Ю. Ал-Аммурі², В. І. Адонін², Кунах В. А.²

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64, e-mail: Parnikoza@gmail.com;
²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03143, Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

Методом парной линейной регрессии выявлена опосредованная связь процессов пролиферации и дифференциации в клеточной линии K-27 (5C) *R. serpentina* — продуцента индолиновых алкалоидов. Амитотическая пролиферация связана с образованием трахеидных элементов, которые в свою очередь выявляют связь с накоплением сухой биомассы. Динамика митотической пролиферации связана с динамикой накопления индолиновых алкалоидов.
Ключевые слова: *Rauwolfia serpentina*, пролиферация, дифференциация, культура тканей растений, клеточные линии — продуценты алкалоидов.

THE PECULARITIES OF PROLIFERATION
AND DIFFERENTIATION PROCESSES
IN *RAUWOLFIA SERPENTINA* BENTH.
TISSUE CULTURE

I. Yu. Parnikoza¹, N. Yu. Miryuta²,
Yu. Al-Ammuri², V. I. Adonin², V. A. Kunakh²

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine, 01033, Kyiv, Volodimirska st., 64, e-mail: Parnikoza@gmail.com
²Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo st., 150, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

The study by pair linear regression method in *R. serpentina* cell line K-27 (5C) revealed a correlation between processes of amitotic proliferation and tracheary elements differentiation, the latter influencing dry biomass accumulation. Mitotic proliferation is connected with indoline alkaloids accumulation.
Key words: *Rauwolfia serpentina*, proliferation, differentiation, plant tissue culture, cell line products of alkaloids.

УДК 582.594- 575.16

**МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ VANILLA PLANIFOLIA
 G. JACKSON (ORCHIDACEAE JUSS.)
 В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ IN VITRO**

А. Н. ЛАВРЕНТЬЕВА, Р. В. ИВАННИКОВ

Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины,
 Украина, 01014, Киев, ул. Тимирязевская, 1,
 e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

Для размножения *V. planifolia* использовали семена репродукции НБС НАН Украины. На модифицированной среде Кнудсона "С" из семян формировались сеянцы. В дальнейшем сеянцы черенковали, получая необходимое количество растений. Для микрклонального размножения в качестве эксплантов использовали участки стебля с пазушными почками, которые культивировали на среде Мурасиге-Скуга с добавлением ауксинов и цитокининов, получая протокормы и побеги. Сеянцы использовали как вторичные экспланты. Полученные растения *V. planifolia* культивировали в теплице и реализовывали. Ключевые слова: *Vanilla planifolia*, микроразмножение, протокорм, in vitro.

Введение. *V. planifolia* — первая американская орхидея, которая стала известна европейцам. Она произрастает в Центральной и Южной Америке, Индии, Малайзии, Филиппинах, Мадагаскаре, Сейшельских островах и островах Тихого океана. Изначально *V. planifolia* культивировали как пряность — это одна из немногих орхидей, продукты переработки которой нашли широкое применение в кондитерской промышленности. С изобретением синтеза искусственного ванилина площади под этой культурой существенно сократились. Сегодня основные плантации *V. planifolia* находятся на о. Мадагаскар. Ваниль выращивают как экзотическое комнатное растение. Кроме того, *V. planifolia* занесена в фармакопеи многих стран мира и является оригинальным украшением ботанических коллекций [1].

V. planifolia — эпифитное растение с вьющимся, моноподиальным побегом, достигающим 10–15 м в высоту. Листья мясистые, вытянутые, до 20 см в длину. Каждое междоузлие несёт воздушные корни. Цветов в соцветии не более 10, зеленовато-жёлтого цвета. Цветёт ваниль в течение 7–10 дней и в природе опыляется колибри или пчёла-

ми. Плоды ванили (или "бобы ванили") сочные, цилиндрической формы длиной до 20 см и толщиной до 1,5 см.

Однако это интересное растение подвержено очень многим заболеваниям и, в первую очередь, различным гнилям корневой системы. Возбудители находятся в почве и в течение многих лет могут инфицировать растения. Кроме того, подобного рода заболевания передаются при черенковании, что отрицательно сказывается на её культивировании в оранжерейных условиях. Эту проблему можно решить двояко:

- получением с помощью современных биотехнологических методов устойчивых к данному патогену форм;
- размножением культурных форм ванили плосколистой с помощью метода культуры *in vitro*.

Материалы и методы

Для проведения исследований мы использовали как семена, так и латеральные почки, взятые от генеративных растений, культивируемых в условиях оранжерей НБС НАН Украины. Первичный материал *V. planifolia* был получен нами из Главного ботанического сада (г. Москва) в 1974 г.

Поверхность и форму семян исследовали под электронным сканирующим микроскопом РЕММА-102. Семена *V. planifolia* стерилизовали в мешочках из шёлка, помещая последовательно в Chlorox — 15 мин и H_2O_2 (15%) — 15 мин. После каждого стерилизующего агента семена промывали стерильной водой. Синтактных, генеративных растений вычленили экспланты, содержащие по одной почке. Схема стерилизации следующая: спирт (70%) —

1 мин; Thimerosal (0,01%) — 15 мин; Chlorox — 15 мин; H_2O_2 (15%) — 10 мин с последующей трёхкратной промывкой стерильной водой. Затем из них делали кубические высечки (5мм x 5мм x 10мм) с одной почкой в центре.

Семена проращивали на твёрдой питательной среде в колбах Эрленмейера (250 мл). Начальный этап культивирования эксплантов производился также на агаризированной среде в "сахарных" пробирках. Растения содержали в культуральном помещении при температуре 25–28 °С, влажности 70%, 16-ти часовом фотопериоде (интенсивность освещения 3-4 тыс. Лк).

Семена *V. planifolia* культивировали на модифицированной питательной среде Кнудсона "С" (КПУ) с агаром, пептоном, гуматом калия и активированным углем, а экспланты на твёрдой среде Мурасиге-Скуга (МС) с различными композициями ауксинов и цитокининов. Среда, используемая в опытах, стерилизовали при 0,9 атм. в автоклаве в течение 20 мин.

Для получения семян *V. planifolia* была применена методика опыления цветов орхидных, разработанная в НБС НАН Украины. Опыление производили в утренние часы при солнечной погоде. Опыляли, как правило, цветок, находящийся у основания соцветия, что даёт возможность определить точный срок созревания плода [1].

Для семенного размножения *V. planifolia* в культуре *in vitro* использовали два способа посева семян. В первом случае давали возможность плоду полностью созреть. После созревания плод растрескивается (как это и происходит в природе). При этом теряет часть семян и утрачивается их сте-

рительность. Известно, что семена орхидей созревают значительно раньше, чем сами плоды. В связи с этим, суть второго способа как раз состояла в использовании для высева семян из не полностью вызревших (не раскрывшихся) плодов [2]. Преимуществом данного метода является значительное сокращение времени получения сеянцев. К недостаткам же следует отнести невозможность длительного хранения семян, определения точных сроков их созревания и линейных размеров. Существует также вероятность посева семян с несформировавшимся зародышем. Несмотря на это, можно утверждать, что в зависимости от поставленной задачи оба способа высева семян могут использоваться в практике семенного размножения орхидных.

Результаты и обсуждение

Семена *V. planifolia* начали прорастать через 3 недели после посева, причём всхожесть составила 100%. Отличительной чертой онтогенеза орхидных есть способность представителей этого семейства формировать на ранних этапах онтогенеза специфические структуры, называемые протокормами (как *in situ*, так и *in vitro*). Однако в асептической культуре, под влиянием различных регуляторов роста и прочих компонентов питательной среды, может происходить образование так называемых "вторичных протокормов", формирующихся на теле первичного.

Характерной особенностью семян *V. planifolia* являются их относительно крупные размеры, округлая форма. Семена *V. planifolia* не имеют высокоспециализированной плёнчатой оболочки,

которая характерна для подавляющего большинства орхидных (рис. 1). В связи с этим их прорастание, образование протокормов полностью зависит от состава питательной среды

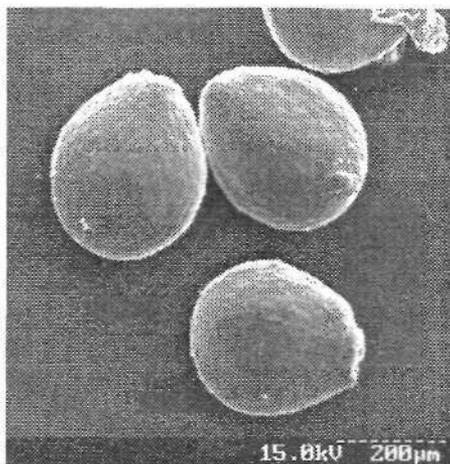


Рисунок 1. Семена *Vanilla planifolia*

Для получения сеянцев многих видов орхидных используют различные модификации сред Кнудсона, Мурасиге-Скуга, Лисмайера-Скуга [3–6]. Как показали наши исследования, разработанная нами модификация среды Кнудсона "С" является наиболее оптимальной для получения не только сеянцев *V. planifolia*, но и других видов орхидных. В присутствии физиологически активных веществ гумусовой природы и пептона сеянцы более полно используют элементы минерального питания, в результате чего лучше развивается ассимилирующая поверхность листьев и активизируются корнеобразовательные процессы. Добавление активированного угля обеспечивает затемнение среды для нормального развития корней, а адсорбирующие свойства угля способствуют равномерному распре-

делению питательных элементов в среде и удалению продуктов метаболизма развивающихся растений [4]. Добавление к среде аденина способствует более интенсивному формированию вторичных протокормов.

В результате проведенных нами исследований был подобран состав питательной среды для проращивания семян орхидных, который не только сокращал сроки прорастания семян, но и способствовал более быстрому развитию сеянцев [2]. На среде такого состава формирование первичных протокормов происходило в течение третьей недели культивирования.

В течение последующих 2-х недель культивирования формировались первые листовидные органы. Корни образовывались на 7-й неделе культивирования. Через 8 недель выращивания были получены хорошо развитые сеянцы с 3–4 листьями и 2–3 корнями. Для массового размножения *V. planifolia* было разработано два способа. Первый состоял в том, что полученные первичные ППТ делили на 2–3 сегмента, каждый из которых субкультивировали на среде Кнудсона "С" с 2 мг/л аденина. При этом нами было получено большое количество вторичных протокормов. Ювенильные растения *V. planifolia* также можно успешно размножать с помощью микрочеренкования (рис. 2).

Для этого побеги разрезали на части, каждая из которых содержала одну пазушную почку. Через 50–60 суток культивирования формировались растения, пригодные для высадки в субстрат. Кроме того, было показано, что для увеличения коэффициента размножения сеянцы, полученные в условиях асептической культуры, можно использовать как вторичные эксп-

ланты. В асептических условиях сеянцы разделяли на части (листья, корни, побеги). На питательной среде Кнудсона "С" с аденином базальные части листьев формировали ППТ, а потом и растения. Части стебля на этой же среде регенерировали полноценные растения. Вызвать органогенез у эксплантов из корней сеянцев не удалось.

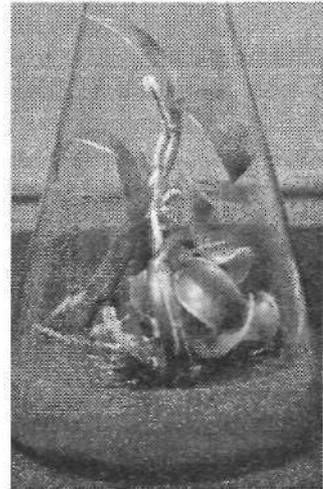


Рисунок 2. Ювенильные растения *Vanilla planifolia* in vitro

Для клонального микроразмножения *V. planifolia* как экспланты мы использовали части побегов взрослых растений с латеральными почками, которые культивировали на среде МС с 2 мг/л аденина. Некоторые авторы культивировали такие же экспланты на среде Линсмайера-Скуга [5–7]. Другие же получали побеги на среде Кнудсона "С" [3, 8]. В наших исследованиях образование множества вторичных ППТ и побегов наблюдалось на среде М-С с 4 мг/л аденина. В тоже время некоторые авторы для получения побегов *V. planifolia* применяли среду, используемую для культивирования кончиков ли-

ствьев *Cattleya Lindl.* (Orchidaceae Juss.).

Отдельные исследования посвящены изучению возможности культивирования кончиков корней взрослых растений *V. planifolia*. Высечки корней культивировали на бумажных мостиках в жидкой среде МС. После 3-х месяцев роста их переносили на твёрдую среду МС с 2 мг/л ИУК и 0,2 мг/л кинетина, где они образовывали множество вторичных протокормов и побегов [9]. Нам, к сожалению, не удалось воспроизвести результаты этого опыта.

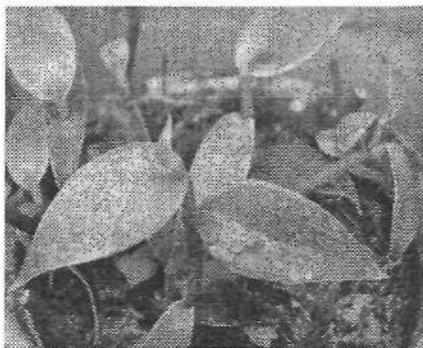


Рисунок 3. Сеянцы *Vanilla planifolia* ex situ

Изолированные латеральные почки *V. planifolia*, по нашим наблюдениям, очень толерантно относятся к изменению концентрации и комбинации компонентов в питательной среде. Так, для инициации первичных протокормов более приемлемым является содержание 30 г/л сахарозы в питательной среде, но для образования адвентивных побегов и корней лучше использовать среды с 15 г/л сахарозы. Среду Кнудсона "С", по нашему мнению, можно использовать для первичного этапа введения эксплантов *V. planifolia* в культуру *in vitro*. Однако в дальнейшем следует использовать среду МС [2,4].

В ряде работ описано действие раз-

личных комбинаций и концентраций цитокининов и ауксинов на развитие эксплантов *V. planifolia* [6,10]. Наши исследования показали, что использование ауксинов не вызывает индукцию ППТ или побегов у латеральных почек *V. planifolia*, но способствует образованию побегов из ППТ и их укоренению. Кроме того, добавление к питательной среде 2 мг/л аденина привело к образованию первичных ППТ, а 4 мг/л аденина вызывало массовую индукцию вторичных протокормов, а затем и побегов.

Оптимальным для регенерации корней и формирования побегов было внесение в среду МС 0,1 мг/л ИУК или 0,5 мг/л ИМК (рис.3). Аналогичные результаты были получены и при культивировании *in vitro* других видов *Vanilla* [12].

Выводы

В результате проведенных исследований были отработаны приёмы введения в асептическую культуру растительного материала *V. planifolia*, подобраны искусственные среды и условия культивирования сеянцев и растений-регенерантов, получен оздоровленный посадочный материал *V. planifolia*, который в дальнейшем использовали как для формирования демонстрационных экспозиций в НБС им. Н.Н. Гришко НАНУ, так и для делектусного обмена между ботаническими садами.

Список литературы

1. Черевченко Т. М., Буян Л. І., Ковальська Л. А., Вахрушкін В. С. Орхідеї.— Київ: Просвіта, 2001.— 224 с.
2. Лаврентьева А. Н., Вахрушкин В. С., Ковальская Л. А. Особенности семенного и клонального размножения ви-

- дов рода *Paphiopedilum* Pfitzg. (Orchidaceae Juss.) в культурі *in vitro* // Биологический вестник Харьковского унта.— 2003.— 7, №1-2.— С. 39–42.
3. Arditti J. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture. // In Orchid biology: Reviews and perspectives. Ithaca, London, Cornell Univ. press., 1977.— 310 p.
 4. Червченко Т. М., Кушнір Г. П. Орхідеи в культурі.— Київ: Наук. думка, 1986.— 200 с.
 5. Lismaier E. M., Skoog F. Organic growth factors requirements of tobacco tissue culture // *Physiol. Plantarum*.— 1965.— 18.— P. 100–127.
 6. Zhuping Gn., Arditti J., Leslie P. N. Vanilla planifolia callus induction and plantlet production *in vitro* // *Lindleyana*.— 1987.— 2, № 1 — P. 48–52.
 7. Philip V. T., Nainar S. A. Z. Clonal propagation of Vanilla planifolia Amer. using tissue culture // *J. Plant Physiol.*— 1986.— 122.— P. 211–215.
 8. Kononowicz H., Janick J. In vitro propagation of Vanilla planifolia. // *Hort. Sci.*— 1984.— №19.— P. 58–59.
 9. Philip V. T., Nainar S. A. Z. In vitro transformation of root meristems to shoot and plantlets in Vanilla planifolia // *Ann. Bot.*— 1988.— 61, № 2 — P. 193–199.
 10. Cervera E., Mandrigal R. In vitro propagation of Vanilla (Vanilla planifolia) // *Env. Exp. Bot.*— 1980.— 21.— P. 441–443.
 11. Agrawal D. C., Morwal G. C., Mascarehas F. In vitro propagation and slow growth storage of shoot cultures of Vanilla walteriae Wight. // *Lindleyana*.— 1992.— 7, № 2 — P. 95–99.

Представлено В. А. Кунахом
Надійшла 17.09.2006

МИКРОПОЗМНОЖЕННЯ *VANILLA*
PLANIFOLIA G. JACKSON
(*ORCHIDACEAE* JUSS.)
В УМОВАХ КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

А. М. Лаврентьева, Р. В. Иванников

Національний ботанічний сад
ім. М. М. Гришка НАН України,
Україна, 01014, Київ, вул. Тімірязєвська, 1,
e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

Для насінневого розмноження представників *V. planifolia* використовували насіння репродукції НБС. Проростки формувались на середовищі Кнудсона "С", після чого їх використовували як матеріал для мікроткляного розмноження. В якості експлантів також використовували сегменти стебел генеративно зрілих рослин, що містили пазушні бруньки. Їх культивували на середовищі Мурасіге-Скуга, що було модифіковане додаванням ауксинів та цитокінінів. В подальшому з цих експлантів було отримано протокорм та пагони. Отримані в асептичних умовах рослини *V. planifolia* наділі дорощували в оранжереях на продаж.
Ключові слова: *Vanilla planifolia*, мікророзмноження, протокорм, *in vitro*.

MICROPROPAGATION OF *VANILLA*
PLANIFOLIA G. JACKSON
(*ORCHIDACEAE* JUSS.) *IN VITRO*

A. Lavrentyeva, R. Ivannikov

M. M. Grishko National Botanical Garden of NASU,
Ukraine, 01014, Kiev, Timiryazevskaya St. 1,
e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

For seed propagation of *V. planifolia* we used seeds from the collection of NBG. Seedlings were formed on Knudson's "C" medium. Then they were cut. The cuttings were used for clonal propagation. The segments of stem with buds from mature plant were used as explants and cultivated on Muraschige-Skoog medium included auxines and cytokinines. Protocorms and shoots were produced from those explants. Regenerated seedlings and plants were used as secondary explants. The plants of *V. planifolia* produced *in vitro* were cultivated in greenhouse for sale.

Key words: *Vanilla planifolia*, micropropagation, protocorm, *in vitro*.

УДК: 575.224.42+577.11.112

МОДУЛЮЮЧА ДІЯ РОСЛИННИХ ЛЕКТИНІВ НА МУТАГЕННИЙ ЕФЕКТ ІОНІВ NI(II) ЗАЛЕЖИТЬ ВІД СТАНУ РЕПАРАТИВНОЇ СИСТЕМИ ТЕСТ-ОБ'ЄКТА *BACILLUS SUBTILIS*

І. С. КАРПОВА, Н. В. КОРЕЦЬКА

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
 Україна, 03143, Київ, вул. Акад. Заболотного, 150,
 E-mail: i.s.karpova@imbg.org.ua

*Досліджено антимуутагенні властивості щодо дії іонів Ni(II) рослинних лектинів — представників різних структурних класів. У штаму *B. subtilis rec** з непошкодженою репаративною функцією виявлено антимуутагенну дію лектинів у ряду: РНА-Р > ConA > STA = VAA > SNA. Два лектини (LAA та WGA) могли підвищувати частоту мутантів. Встановлено, що за відсутності основного білка гомологічної рекомбінації та репарації (*recE4*) тільки два лектини виявляють антимуутагенний ефект. При пошкодженні коректуючої функції ДНК-полімерази III (*polC*) досліджені лектини антимуутагенну активність втрачають. Результати вказують, що антимуутагенний ефект лектинів опосередкований бактеріальними білками, котрі приймають участь у відновленні цілісності ДНК.*

*Ключові слова: іони Ni(II), антимуутагенез, рослинні лектини, мутанти *Bacillus subtilis*, репарація.*

Вступ. Серед речовин з протекторними і антимуутагенними властивостями перевага надається препаратам природного походження, зокрема речовинам-репарогенам, що діють на рівні ДНК [1]. Останнім часом увагу фармакологів привертають вуглеводзв'язувальні білки-лектини. За сучасними уявленнями вони присутні у складі всіх живих організмів [2]. Лектини вступають у прямі нековалентні взаємодії з вуглеводами та глікокон'югатами, а також через рецептори мембран здійснюють сигнальний регуляторний вплив на різні ланки метаболізму. В імунології та цитогенетиці набула використання мітогенна активність лектинів бобових. Відомо також, що деякі лектини злакових виявляють амітогенну активність [3]. Лектин омели білої (*Viscum album*) в Європі вважається одним з кращих протипухлинних засобів [4, 5]. Присутність лектинів у складі всіх без винятку харчових та лікарських рослин робить ак-

туальними дослідження їх потенційної мутагенної/антимутагенної дії, котрі представлені лише поодинокими роботами [5]. Зокрема, для лектину, виділеного нами з суцвіть бузини чорної (*Sambucus nigra*), було показано модулюючий вплив на спонтанний та індукований алкільючим агентом мутаційний процес у соматичних клітинах ссавців *in vitro* [6].

Для більш поглибленого вивчення модулюючого впливу лектинів на мутаційний процес нами була розроблена бактеріальна модельна система *B. subtilis*, яка базується на високій чутливості мутантів з пошкодженою системою репарації/рекомбінації до впливу мутагенів. Застосування цієї системи виявило, що визначальним фактором для прояву генетичних ефектів лектинів є генотип тест-об'єкта за системою репарації/рекомбінації [7, 8].

Метою даної роботи було поглиблене дослідження залежності впливу лектинів, представників різних структурних класів, на мутаційний процес від конкретного типу відновлення цілісності ДНК.

Матеріали і методи

Модельним мутагеном слугували іони Ni(II) у вигляді добре розчинної у воді солі NiCl₂ * 6H₂O (Реахім, Україна).

Як потенційні антимутагени були використані комерційні лектини (ЛЕКТИНОТЕСТ, Львів, Україна), котрі належали до трьох найбільш поширених класів рослинних лектинів (табл. 1).

Тест-об'єктом правили генетично охарактеризовані мутанти *B. subtilis* з Міжнародної колекції (Columbus, Ohio, USA) [9], одержані з лабораторії про-

Таблиця 1. Рослинні лектини, використані в роботі

№	Лектин	Ботанічний вид	Вуглеводна специфічність	Молекул. вага, кДа, субодична організація
Лектини бобових				
1.	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> Канавалія мечовидна	манноза, глюкоза	102 (4)
2.	LAA	<i>Laburnum anagyroides</i> Золотий дощ звичайний	фукоза	н.в.
3.	PHA-P	<i>Phaseolus vulgaris</i> Квасоля звичайна	олігосахариди	126 4(αβ)
Хітинзв'язувальні лектини				
4.	STA	<i>Solanum tuberosum</i> Картопля	N-ацетил- Глюкозамін	100 2(αβ)
5.	WGA	<i>Triticum vulgaris</i> Пшениця звичайна	N-ацетил- Глюкозамін	36 (2)
Інгібітори білкового синтезу				
6.	SNA	<i>Sambucus nigra</i> Бузина чорна	N-ацетил- нейрамінова кислота	140 4(αβ)
7.	VAA	<i>Viscum album</i> Омела біла	Галактоза	115 4(αβ)

фесора А.А.Прозорова (РАН, Москва), що представлені в табл. 2.

Культивування бактерій проводили згідно [8, 10]. Застосовували середовище без додавання глюкози, оскільки вона зменшувала генотоксичну та мутагенну дію Ni(II). Перед кожною серією експериментів культури паспортизували за ауксотрофними маркерами та перевіряли на чутливість до мітоміцину С, що характеризує стан системи репарації. Рівні об'єми стандартизованої суспензії клітин та розчину лектину (200 мкг/мл) у 0,15 М NaCl змішували та інкубували 30 хв при 37 °С. Водний розчин NiCl₂ у концентрації 500 мМ (200 мкл) рівномірно розподіляли по поверхні агаризованого середовища об'ємом 30 мл в чашках Петрі з діаметром 95 мм, після чого висівали 100 мкл дослідної культури з титром 5 × 10⁷ кл/мл.

Критерієм антимутагенної дії лектинів було зменшення кількості колоній, резистентних до впливу іонів Ni(II), яку підраховували через 48 год. росту при 37 °С. Статистичну обробку проводили з врахуванням критерію Ст'юдента за допомогою пакета програм Quattro Pro for Windows.

Результати та обговорення

Як видно з даних табл. 3, одержані результати згруповані згідно структур-

них особливостей лектинів та генотипу ізогенних штамів, котрі відрізняються лише за однією зазначеною мутацією. У штаму BD170 з непошкодженою системою репарації(рекомбінації) реплікації всі лектини виявили достовірну дію на частоту мутантів, резистентних до пошкоджуючої дії іонів Ni(II). Проте характер такої дії залежав від індивідуальних особливостей лектинів. З трьох препаратів лектинів бобових, що мають різну вуглеводну специфічність, два виявили антимутагенну дію (ConA, PHA-P). В той же час лектин лабурнума (LAA) з рідкісною специфічністю до фукози дещо збільшував вихід мутантів.

З двох досліджених хітинзв'язувальних лектинів, котрі мають вуглеводну специфічність до N-ацетил-D-галактозаміну, один збільшував (WGA), а інший зменшував (STA) частоту Ni-резистентних мутантів.

Для інших лектинів (SNA та VAA), що мають різну вуглеводну специфічність (див. табл. 1), виявлено антимутагенну активність. Вони належать до класу химеролектинів і складаються з двох субодиниць — власне лектину та фермента, що гідролізує рибосомальну РНК. Цікаво відмітити, що для даних лектинів раніше було встановлено антимутагенну активність у соматичних клітинах ссавців *in vitro* [4, 6].

Штам BD224, на відміну від BD170, має мутацію *recE4*, котра проявляєть-

Таблиця 2. Штами *B. subtilis*

Назва штаму	Генотип	Тип репарації	Продукт дефектного гена за системою репарації
BD170	<i>thrS trpC2 rec⁺</i>	дикий тип	—
BD293	<i>thrS trpC2 polC</i>	пряма корекція мутаційних пошкоджень	субодиниця ДНК-полімерази III
BD224	<i>thrS trpC2 recE4</i>	постреплікативна репарація, SOS-репарація	аналог основного білка гомологічної рекомбінації <i>RecA E. coli</i>

Таблиця 3. Вплив рослинних лектинів на частоту мутантів *B. subtilis*, резистентних до дії іонів Ni(II)

Назва штаму, генотип	Варіант досліду	Число мутантів, резистентних до дії іонів Ni(II)	
		абсолютне число, 10 ³	% від контролю
BD170 <i>thr5 trpC2 rec⁺</i>	без лектину (контроль)	1,15±0,15	
	ConA	0,35±0,05*	30,43
	LAA	1,55±0,05*	134,78
	PHA-P	0,25±0,05*	21,74
	STA	0,45±0,05*	39,13
	WGA	1,55±0,05*	134,78
	SNA	0,56±0,10*	48,70
	VAA	0,45±0,05*	39,13
BD224 <i>thr5 trpC2 recE4</i>	без лектину (контроль)	1,45±0,05	
	ConA	1,90±0,50	131,03
	LAA	0,73±0,10*	50,34
	PHA-P	1,65±0,15	113,79
	STA	1,90±1,10	131,03
	WGA	1,74±0,20	120,00
	SNA	0,30±0,10*	20,69
	VAA	1,24±0,20	85,52
BD293 <i>thr5 trpC2 poIC</i>	без лектину (контроль)	4,53±0,34	
	ConA	6,53±1,05	144,15
	LAA	3,53±1,05	77,92
	PHA-P	6,43±1,01	141,94
	STA	4,60±0,71	101,55
	WGA	6,60±1,40	145,70
	SNA	5,40±0,20	119,21
	VAA	6,59±0,84*	145,47

* Достовірні відхилення від контролю $p < 0,05$.

ся за сильним пригніченням гомологічної трансформації. Це пов'язано з відсутністю продукту, аналогічного до RecA білка *E. coli* [11, 12]. Крім участі у гомологічній рекомбінації, даний білок здійснює постреплікативну репарацію, а також бере участь у активації SOS-репарації. Внаслідок вказаної мутації характер дії лектинів на індукований му-

таційний процес очевидно змінюється. Лише два лектини (LAA та SNA) мають достовірну антимутагенну дію, в той час як інші лектини, за винятком VAA, виявляють тенденцію до збільшення числа Ni-резистентних мутантів.

Мутант BD293 (*poIC*) має пошкодження коректуючої функції основного фермента реплікації — ДНК-полімера-

зи III, що призводить до підвищення частоти як спонтанного, так і індукованого мутагенезу. Цей штам виявився нечутливим до антимуутагенної дії лектинів відносно ефекту Ni(II). Проте більшість лектинів (крім LAA) характеризувались деяким стимулюючим впливом на вихід мутантів, котрий в разі VAA виявився достовірним.

Отже, одержані результати свідчать, що антимуутагенна дія рослинних лектинів залежить як від структурних особливостей молекули білка, так і у значно більшій мірі від механізмів репарації ДНК.

Висновки

При обробці *гес*⁺ штаму п'ять лектинів виявили антимуутагенну дію відносно ефекту Ni(II) в ряду PHA-P > ConA > STA = VAA > SNA. Два лектини (LAA, WGA) підвищували частоту мутантів у 1,3 раза. Характер дії лектинів на індукований іонами Ni(II) мутаційний процес залежав від їх індивідуальних особливостей, котрі в межах проведеного дослідження не показали зв'язку з вуглеводною специфічністю та приналежністю до певного структурного класу. Встановлена залежність антимуутагенної дії лектинів від генотипу штаму за системою репарації/рекомбінації/реплікації показує, що ефект лектинів проявляється за участі певних бактеріальних білків, котрі беруть участь у відновленні цілісності ДНК.

Перелік літератури

1. Дурнев А. Д., Серединин С. Б. Фармакологические проблемы поиска и применения антимуутагенов // Вестник РАМН.— 1993.— № 1.— С. 19–25.

2. Lis H., Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition // Chem. Revs.— 1998.— 98, № 2.— P. 637–674.
3. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины.— Львов: Вища школа, 1981.— 152 с.
4. Van Damme J. M., Peumans W. J., Pustai A., Bardocz S. Handbook of plant lectins : properties and biomedical applications.— Chichester Inc.: John Wiley and Sons, 1998.— 451 p.
5. Bussing A., Lehnert A., Schink M., Mertens R., Schweizer K. Effect of Viscum album L. on rapidly proliferating amniotic fluid cells Sister chromatid exchange frequency and proliferation index // Arzneimittel-Forschung/Drug Research.— 1995.— 45, № 1.— P. 81–83.
6. Лукаш Л. Л., Карпова И. С., Мирошниченко О. С., Тихонова Т. Н., Лыло В. В., Манько В. Г., Сухорада Е. М., Гольинская Е. Л. Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика.— 1997.— 31, № 5.— С. 52–60.
7. Kada T., Sadaie Y., Sakamoto Y. // Handbook of mutagenicity test procedures // Ed. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel.— Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1984.— P. 13–31.
8. Карпова И. С., Корецька Н. В. Дослідження модифікуючого впливу лектинів на токсичність і мутагенність іонів Ni(II) в культурі *Bacillus subtilis* // Біополімери і клітина.— 2003.— 19, № 3.— С. 224–230.
9. *Bacillus* genetic stock center. Strains and data/Fourth edition. Columbus, Ohio, USA.— 1989.— 160 p.
10. Прозоров А. А. Трансформация у бактерий.— М.: Наука, 1988.— 256 с.
11. Барабанщиков Б. И. Механизмы репарации, рекомбинации и мутагенеза бактерий.— Казань: Изд. казанского университета, 1984.— 120 с.
12. Alonso J. C., Luder G., Trautner T. A. Intramolecular homologous recombina-

tion in *Bacillus subtilis* 168 // Mol. Gen. Genet. — 1992. — 236, № 1. — P. 60–64.

Представлено В. А. Кунахом
Надійшла 30.11.2006

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ
РАСТИТЕЛЬНЫХ ЛЕКТИНОВ
НА МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ИОНОВ Ni(II)
ЗАВИСИТ ОТ СОСТОЯНИЯ
РЕПАРАТИВНОЙ СИСТЕМЫ
ТЕСТ-ОБЪЕКТА *BACILLUS SUBTILIS*

И. С. Карпова, Н. В. Корецька

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, Киев,
ул. Акад. Заболотного, 150,
E-mail: i.s.karpova@imbg.org.ua

Исследовались антимутагенные свойства относительно действия ионов Ni(II) растительных лектинов — представителей различных структурных классов. У штамма *B. subtilis* rec⁺ с неповрежденной репаративной функцией обнаружено антимутагенное действие лектинов в последовательности: PHA-P > ConA > STA = VAA > SNA. Два лектина (LAA и WGA) могли повышать частоту мутантов. Показано, что в случае отсутствия основного белка гомологичной рекомбинации и репарации (recE4) только два лектина проявляют антимутагенный эффект. При повреждении корректирующей функции ДНК-полимеразы III (polC) исследуемые лектины теряют антимутагенную активность. Результаты показывают, что антимутагенный эффект лектинов опосредован бактериальными белками,

принимающими участие в восстановлении целостности ДНК.

Ключевые слова: ионы Ni(II), антимутагенез, растительные лектины, мутанты *Bacillus subtilis*, репарация.

MODULATING ACTION OF PLANT LECTINS
ON Ni(II) INDUCED MUTAGENESIS
DEPENDS ON REPAIR SYSTEM CONDITION
OF THE TEST-OBJECT *BACILLUS SUBTILIS*

I. S. Karpova, N. V. Koretska

Institute of Molecular Biology and Genetics
NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv,
Acad. Zabolotnoho str., 150,
E-mail: i.s.karpova@imbg.org.ua

Antimutagenic activity of plant lectins — representatives of different structural classes — against nickel ions have been studied. The antimutagenic effect of the lectins was shown in range PHA-P > ConA > STA = VAA > SNA for *B. subtilis* rec⁺ strain with the repair system of wild type. Two lectins (LAA and WGA) can increase the frequency of mutants. It was shown that when the main protein, promoting homologous recombination and repair (recE) was absent only two lectins demonstrated the antimutagenic activity. There was no antimutagenic effect of the lectins in the case when correcting function of the DNA-polymerase III (polC) was damaged. The results show that the antimutagenic activity of the lectins involves bacterial proteins, which take part in DNA repair.

Key words: Ni(II) ions, antimutagenic activity, plant lectins, mutants of *Bacillus subtilis*, repair.

УДК: 633.63:631.527

СТВОРЕННЯ ЗАПИЛЮВАЧА О-ТИПУ У КОРМОВИХ БУРЯКІВ ЗА ВИКОРИСТАННЯ МАРКЕРНОЇ ОЗНАКИ ЛИСТКОВОГО АПАРАТУ

І. І. ЛЯЛЬКО, О. В. ДУБРОВНА

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
 Україна, 03042, Київ, вул. Васильківська, 31/17

Отримано запилювач О-типу та його чоловічостерильний аналог з маркерною ознакою листкового апарату для гетерозисної селекції кормових буряків. Показано, що опушеність молодих листочків у даної культури може бути використана, як надійний морфологічний маркер гібридності потомств в генетико-селекційних дослідженнях.

Ключові слова: кормові буряки, цитоплазматична чоловіча стерильність, запилювачі О-типу, морфологічні маркери.

Вступ. Кормові буряки (*Beta vulgaris var. alba*) — цінна кормова культура, яка за поживністю займає одне з провідних місць серед кормових коренеплодів. Одержання високопродуктивних гібридів цієї культури пов'язане зі складним селекційним процесом. Головним напрямком створення гетерозисних гібридів кормових буряків на сучасному етапі є одержання триплоїдних гібридів на стерильній основі. У селекції і насінництві для створення таких форм особливого значення набувають закріплювачі стерильності, за допомогою яких підтримуються та розмножуються чоловічостерильні форми — материнський компонент гібридів. Проте, на відміну від цукрових буряків, де використання явища цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) набуло широкого вжитку, одержано багато закріплювачів стерильності та їх ЧС аналогів, виділення запилювачів О-типу у кормових пов'язано із значними труднощами. Практикою встановлено, що частота зустрічальності закріплювачів стерильності у цукрових буряків коливається залежно від вихідних матеріалів в основному від 0,3 до 3,0%, в той же час у кормових вона значно нижча.

При створенні запилювачів О-типу у даної культури необхідна наявність генетичних маркерів, які б дозволяли не тільки чітко контролювати хід селекційного процесу на будь-яких стадіях, але й також надавали б змогу більш ефективно добирати закріплювачі стерильності, які за феноти-

пом не відрізняються від фертильних рослин з іншими генотипами.

Не дивлячись на те, що на сучасному етапі для характеристики селекційних матеріалів використовують цитологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярні маркери [1–4], які надають можливість більш ефективно добирати батьківські форми, оцінювати їх потомство, картувати локуси, що контролюють продуктивність [5–8], застосування морфологічних маркерів в генетико-селекційних дослідженнях не втратило своєї актуальності. Такі маркери досить інформативні, чітко ідентифікуються візуально при фенологічних дослідженнях і є об'єктивним критерієм гібридності, що робить їх найбільш придатними та економічними для практичних розробок.

Незначна фенотипічна різноманітність кормових буряків обумовила використання в якості маркерних ознак, головним чином, забарвлення та форму коренеплоду [9]. Проте пошук нових морфологічних маркерів та встановлення їх кореляційних зв'язків з господарськими показниками, особливо при створенні запліювачів О-типу у даної культури, є нагальною потребою сучасної селекції.

Метою даної роботи було створення закріплювачів стерильності та їх чоловічостерильних аналогів кормових буряків з маркерною ознакою опушеності листового апарату для використання в гетерозисній селекції.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були фертильні мутантні форми кормових буряків з опушеними листовими плас-

тинками. В якості материнського компонента схрещування використовували стерильну форму кормових буряків селекції фірми KWS (Німеччина). Парні схрещування при отриманні пробних гібридів F_1 проводили із застосуванням парних бязевих ізоляторів. Отримання гібридів від насичуючих схрещувань здійснювали під груповими ізоляторами або на ізольованих клумбах гібридизації. Аналізували не менше 50 рослин по кожній комбінації схрещувань. Бекросування проводили протягом чотирьох поколінь. Потомства аналізували за ступенем стерильності в польових умовах візуально і за допомогою мікроскопа МБІ-3 із збільшенням 10×15 — в лабораторних. Ідентифікацію рослин за типами стерильності здійснювали за загальноприйнятою класифікацією.

Для введення в культуру *in vitro* використовували насіння обох форм буряків. Зрілі зародки механічно звільняли від оплудня, стерилізували і пророщували в чашках Петрі на фільтрувальному папері. Стерильні проростки вирощували на середовищі ДС-2 (1/2 МаЕ по МС, сахароза 3,0%, без регуляторів росту і мезоінозиту). Експериментальний матеріал культивували при температурі 26 °С, освітленні 4 клк та 16-годинному фотоперіоді. В якості експлантів використовували, головним чином, листок з черешком. Пагони довжиною 1–2 см переносили для дощухування на модифіковані нами середовища ДС. Через 7–10 днів вони мали висоту 4–6 см, через 10–20 днів до 60–80% регенерантів формували корені. Пагони з міцною кореневою системою переносили з умов *in vitro* у вазони з ґрунтом і для підтримання вологого середовища накривали скляни-

ми посудинами. Через 2 тижні рослини з вазонів пересаджували у відкритий ґрунт.

Результати та обговорення

Серед самозапильних однонасінних матеріалів кормових буряків зарубіжної селекції було виділено мутантні форми з новою для даної культури ознакою — опушеністю молодих листочків [10]. Аналіз її успадкування в наступних інбредних поколіннях показав, що вона стабільно передається по потомствах і не залежить від умов вирощування. Опушеність починає проявлятися з появою 3–4-ї пари справжнього листа і зберігається на ранніх стадіях розвитку листового апарату протягом всього періоду онтогенезу. У міру того, як листок росте і розвивається, опушеність стає все менш вираженою і поступово зникає зовсім. Дорослий лист за фенотипом не відрізняється від звичайного. На підставі гібридологіч-

ного аналізу нами було встановлено, що ознака домінантна і успадковується за моногенним типом [10]. Подібна ознака була раніше виділена нами серед інбредних ліній цукрових буряків [11]. Проведений тест на аallelність генів, що детермінують прояв ознаки у цукрових і кормових буряків, показав, що ознака опушеності листових пластинок у них контролюється двома незалежними генами ($H1$ та $H1^{ar}$), які взаємодіють між собою за принципом домінантного епістазу [10].

Встановлено, що виділена ознака є надійним генетичним маркером при генетико-селекційних дослідженнях. Для цукрових буряків показано, що форми з опушеним листовим апаратом мають високу закріплюючу здатність, а біотики з максимальним її проявом є універсальними закріплювачами стерильності [12]. Тому рослини кормових буряків, які мають опушені молоді листочки, також були перевірені за реакцією на ЦЧС (табл. 1).

Таблиця 1. Закріплююча здатність рослин кормових буряків з маркерною ознакою листових пластинок

Комбінація схрещування	Вивчено рослин, шт.	З них, %		
		стерильні	н/с I	н/с II
ЧС x К-14	81	47,9	26,6	25,5
ЧС x К-56	98	44,4	18,5	37,1
ЧС x К-34	64	9,4	20,3	70,3
ЧС x К-4	59	6,8	22,0	71,2
ЧС x К-62	67	4,8	10,4	84,8
ЧС x К-1	63	4,8	9,5	85,7
ЧС x К-23	58	3,4	12,1	84,5
ЧС x К-29	74	1,3	16,2	82,5
ЧС x К-73	69	-	4,3	95,7
ЧС x К-42	51	-	-	100,0

Фенотипічний аналіз потомств, одержаних від пробних схрещувань ЧС форм з кандидатами у запилювачі О-типу, засвідчив, що всі гібридні рослини мали опушені молоді листочки.

Серед 76 кандидатів у запилювачі стерильності виділилося два (К-14 та К-56), у потомствах яких ідентифіковано 74,5 та 62,9 відсотків стерильних та напівстерильних I типу насінників. Останні для селекційної практики мають таке ж значення, як і повністю стерильні форми. В потомствах шести запилювачів визначено від 4,3 до 28,8% стерильних біотипів. Найбільша кількість запилювачів характеризувалася проміжною реакцією на ЦЧС — їх потомства були представлені, головним чином, напівстерильними II типу насінниками, серед яких зустрічалися в різних співвідношеннях фертильні рослини. Отримані результати показали відсутність кореляції між ознакою опушеності листових пластинок у кормових буряків і закріплюючою здатністю.

Запилювачі К-14 та К-56 були розмножені під парним ізолятором. Серед рослин, вирощених із отриманого насіння за морфологічними ознаками, в тому числі за однонасінністю, відібрано кандидати у запилювачі О-типу.

Отримання ЧС аналогів закріплювачів стерильності зазвичай здійснюється методом беккросів із проведенням їх у строго контрольованих умовах з постійним аналізом потомств за ознакою "стерильність". Практикою показано, що для досягнення схожості між обома формами треба провести 3–4 зворотних схрещувань.

Аналіз гібридних потомств першого покоління показав, що три з них представлені стерильними та напів-

стерильними першого типу насінниками. У трьох інших потомствах відмічено незначну кількість напівфертильних насінників (1,8; 3,1 та 5,5%) (табл. 2).

У гібридному потомстві запилювача К-6, одержаного після першого насичуючого схрещування, значно зменшилася кількість стерильних форм за рахунок збільшення напівстерильних обох типів рослин, а після другого беккросу не відмічено стерильних насінників, практично всі вони ідентифікувались як напівфертильні. Про подібні результати повідомляли практично всі дослідники, які працювали з ЦЧС. На думку авторів, це свідчить про більш складний характер успадкування ознаки "стерильність", ніж припускає двогенна схема, запропонована Оуеном.

В гібридних потомствах К-4 та К-5 кількість повністю стерильних та напівстерильних I типу насінників залишалася приблизно однаковою і знаходилася на рівні, отриманому від пробного схрещування. У всіх потомствах відмічалася незначна кількість насінників напівстерильних II типу. Їх появу можна пояснити наявністю генів-модификаторів та існуванням двох генотипів у фенотипічно однакових стерильних рослин.

Одночасно з проведенням другого насичуючого схрещування ті ж самі запилювачі були використані для повторних закріплюючих схрещувань з новими рослинами тієї ж чоловічостерильної форми. Результати розщеплення потомств обох типів схрещувань у запилювача К-5 були практично однаковими.

У той же час повторне закріплююче схрещування із запилювачем К-4 виявило значно більшу кількість повністю стерильних рослин, ніж після другого беккросу, відповідно 87,9 та 61,1%. Крім

Створення запилювача О-типу у кормових буряків за використання маркерної...

Таблиця 2. Успадкування ступеня стерильності у потомствах чоловічостерильних форм кормових буряків за беккросування

Комбінація схрещування	Генерація	Кількість вивчених рослин, шт.	Співвідношення фенотипів, %		
			стерильні	н/с I	н/с II
ЧС х К-1	F ₁	52	86,5	13,5	-
	F ₁ BC ₁	76	86,8	13,2	-
	F ₁ BC ₂	55	85,4	14,6	-
	F ₁ BC ₃	70	97,1	2,9	-
ЧС х К-2	F ₁	189	84,7	15,3	-
	F ₁ BC ₁	96	86,5	13,5	-
	F ₁ BC ₂	104	91,4	8,6	-
	F ₁ BC ₃	87	97,7	2,3	-
ЧС х К-3	F ₁	64	71,8	28,2	-
	F ₁ BC ₁	85	85,9	14,1	-
	F ₁ BC ₂	70	97,2	2,8	-
	F ₁ BC ₃	57	98,2	1,8	-
ЧС х К-4	F ₁	55	65,5	37,2	1,8
	F ₁ BC ₁	64	64,1	31,2	4,7
	F ₁ BC ₂	54	61,1	32,5	3,7
	F ₁ BC ₃	72	65,3	31,9	2,8
	F ₁	58	87,9	11,2	0,9
ЧС х К-5	F ₁	40	65,7	31,2	3,1
	F ₁ BC ₁	52	65,7	28,6	5,7
	F ₁ BC ₂	60	62,5	27,9	9,6
	F ₁ BC ₃	81	66,7	27,2	6,2
	F ₁	59	69,5	23,7	6,8
ЧС х К-6	F ₁	52	59,6	26,9	13,5
	F ₁ BC ₁	67	32,8	46,3	20,1
	F ₁ BC ₂	61	-	9,8	90,2

того, у результаті насичуючого схрещування відмічено 3,7% насінників напівстерильних II типу, в той час, як після контролюючого — тільки 0,9%. У даному випадку, вірогідно, результати залежать від генотипів чоловічостерильної форми. За отриманими результатами обидва запилювача були ідентифіковані

нами, як закріплювачі рамонського типу, тобто були доміантними гомозиготами по одному з генів закріплення стерильності (Х або Z) [13].

Потомства запилювачів К-1, К-2 та К-3 після трьох беккросів були представлені на 97,1–97,9% повністю стерильними формами, при наступних беккросах

всі запилювачі стійко зберігали здатність до закріплення стерильності.

Для практичного використання створених запилювачів О-типу та чоловічостерильних форм в генетико-селекційних дослідженнях необхідно розмножити їх в достатній кількості. Разом з тим, буряки — дворічна перехреснозапилена культура, яка традиційно розмножується дуже повільно. На практиці часто виникають труднощі, пов'язані із підтриманням та збереженням у чистоті виділених генотипів. Вирішення цих проблем стало можливим із розробкою нових методів вегетативного розмноження буряків — клонального мікророзмноження в умовах *in vitro*.

Розмноження одержаних закріплювачів стерильності, маркованих морфологічним геном *H^{var}*, здійснювали шляхом прямої регенерації рослин із тканин експланта [14, 15]. Для мікроклонування був застосований метод, який базується на пересадках на живильні середовища експлантів із вегетативних органів рослин, попередньо вирощених в умовах *in vitro* [16].

Регенерація розеток, як правило, відбувалася на черешку і центральній жилці листка. На одному експланті формувалося від 6 до 15 пагонів. Регенераційна здатність досліджуваних форм варіювала від 24 до 39%. Одержані мікропагони були дорощені, укорінені та перенесені з умов *in vitro* в умови *in vivo*. Приживлюваність рослин-регенерантів в ґрунті складала від 70 до 90%.

Під час культивування в умовах *in vitro* у рослин спостерігалася опушеність листочків, але її експресивність була дещо меншою, ніж у інтактних рослин. В ґрунтових умовах у рос-

лин-регенерантів першого року життя прояв мутантної ознаки чітко виявлявся протягом всього періоду вегетації, а у рослин другого року — у фазі відростаючої розетки і за фенотипом вони не відрізнялися від вихідних матеріалів. Аналіз насінників за пилкоутворюючою здатністю запилювача і ступенем стерильності у ЧС форми показав, що рослини запилювача мали звичайний фертильний пилок, а ЧС аналог був представлений стерильними або напівстерильними І типу формами.

Таким чином, за використання ознаки опушеності молодих листочків отримано новий вихідний матеріал для гетерозисної селекції кормових буряків. Показано, що ознака опушеності, виділена у кормових буряків, на відміну від аналогічної ознаки цукрових, не корелює із закріплюючою здатністю, але може бути використана як надійний морфологічний маркер, який дозволяє безпомилково проводити вибірку не гібридних форм при генетико-селекційних дослідженнях.

Перелік літератури

1. Baranski R., Ford-Lloyd B., Michalic B. Identification of beetroot genotypes using RAPD markers // Induced. Mutat. and Mol. Techn. Crop. Improv. Proc. Int. Symp., Vienna, 19-23 June, 1995. — Vienna, 1995. — P. 570-572.
2. Westphal L. Genetische Mfrker in Cler Zuchtung // FASPO. — Gartenbaumag. — 1995. — 4, № 11. — P. 12.
3. Дубровна О. В. Цитогенетичні особливості інбредних ліній цукрового буряка з різною комбінаційною здатністю // Биополимеры и клетка. — 1995. — 11, № 1. — С. 95-99.
4. Лісневич Л. А. Запасні білки насіння буряків. — К.: Логос, 2001. — 190 с.
5. Rae S., Aldan C., Domingues I. Development and incorporation of microsatellite

- markers into the linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Theor. and Appl. Genet.*— 2000.— 100, N 8.— P. 1240–1248.
6. Shavrukov Y. Lokalization of ntw mono-germ and late-bolting genes in suger beet using RFLP markers // *J. Sugar Beet Res.*— 2000.— 37, N 4.— P. 107–115.
 7. Uphoff H., Wricke G. A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) RAPD markers // *Plant. Breed.*— 1995.— 114, N 4.— P. 335–357.
 8. Weber W., Borchardt D., Koch G. Combined linkage maps and QTLs in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Ibid.*— 1999.— N 3.— P. 193–204.
 9. Шевцов І. А., Фомичев А. М. Биология и агротехника кормовой свеклы.— Киев: Наук. думка, 1980.— 250 с.
 10. Лялько І. І., Дубровная О. В., Шевцов І. А. Проявление признака опушенности листовой пластинки у кормовой свеклы // *Цитология и генетика.*— 2001.— 35, № 4.— С. 45–49.
 11. Лялько І. І., Шевцов І. А., Щекина Е. П. Новые мутации по форме листа у сахарной свеклы // *Цитология и генетика.*— 1995.— 29, № 2.— С. 17–20.
 12. Лялько І. І., Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Шевцов І. А. Характер сладковости новых маркерных ознак листового апарату цукрового буряку // *Доп. НАН України.*— 1999.— № 3.— С. 201–205.
 13. Балков И. Я. ЦМС сахарной свеклы. М.: Агропромиздат.— 1990.— 240 с.
 14. Свирищевская А. М., Бормотов В. Е. Культура тканей сахарной свеклы. Минск.— 1994.— 141 с.
 15. Редько В. І., Недяк Т. М., Дубін О. В., Николаєнко Г. П. Розмноження та збереження селекційних матеріалів цукрових буряків *in vitro* // *Збірник наук. праць ІЦБ.*— К.— 2000.— вип. 2, книга 1.— С. 123–131.
 16. Дубровна О. В., Лялько І. І. Мікроклональне відтворення селекційно-цінних форм цукрових і кормових буряків // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* К.— 2000.— С. 410–414.

Представлено М. В. Роїком
Надійшла 15.11.2006

СОЗДАНИЕ ЗАКРЕПИТЕЛЯ O-ТИПА У КОРМОВОЙ СВЕКЛЫ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МАРКЕРНОГО ПРИЗНАКА ЛИСТОВОГО АПАРАТА

И. И. Лялько, О. В. Дубровная

Институт физиологии растений
и генетики НАН Украины,
Украина, 03042, Киев,
ул. Васильковская, 31/17

Получен опылитель O-типа и его мужско-стерильный аналог с маркерным признаком листового аппарата для гетерозисной селекции кормовой свеклы. Показано, что опушенность молодых листочков у данной культуры может быть использована как надежный морфологический маркер гибридности потомств в генетико-селекционных исследованиях.

Ключевые слова: кормовая свекла, цитоплазматическая мужская стерильность, опылители O-типа, морфологические маркеры.

CREATION OF THE POLLINATOR O-TYPE OF FODDER BEET USING MARKER SIGN OF LEAF'S APPARATUS

I. I. Lyalko, O. V. Dubrovnyaya

Institute of Plant Physiology and Genetics of
Ukraine,
Ukraine, 03042, Kiev, Vasylykivska St, 31/17

The pollinator O-type and its male sterility analogue with marker attribute of leaf's apparatus for heterosis selections of the fodder beet was received. It is shown, that hairiness of young leaflets in this culture can be used as a reliable morphological marker of a hybridity of offsprings in genetic and selection researches.

Key words: fodder beet, male sterility, pollinators O-type, morphological markers.

УДК 612.014.482:575.191

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ
ФОРМУВАННЯ РАДІОЧУТЛИВОСТІ ЛЮДИНИ**Н. М. РЯБЧЕНКО¹, Е. А. ДЬОМІНА¹, І. Р. БАРИЛЯК²¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: drozd@onconet.kiev.ua

²Науковий центр радіаційної медицини АМН України

Україна, 04050, Київ, вул. Мельникова, 53

Тел: 238-25-70, E-mail: baryliak@kyivutel.net.ua

Коротко висвітлено молекулярно-генетичні основи формування індивідуальної радіочутливості людини. Систематизовано дані літератури відносно основних етапів формування відповіді клітини на променеву дію, кандидатних генів радіочутливості та сучасних методичних, а саме — цитогенетичних, аспектів її оцінки і прогнозування.

Ключові слова: радіочутливість, нестабільність геному, аберації хромосом, цитогенетичне обстеження.

Вступ. В сучасній фундаментальній та клінічній радіобіології накопичено великий фактичний матеріал щодо біологічних ефектів дії радіації різної якості в широкому діапазоні доз на молекулярному, генетичному, клітинному та популяційному рівнях. Проте на фоні досягнень виконаних досліджень проблема визначення індивідуальної радіочутливості (IP) організму людини та її коливань у окремих осіб залишається практично не вирішеною.

Термін “радіочутливість” в широкому розумінні застосовується як синонім кінцевої реакції біологічного об’єкта на променеву дію. Відомо, що радіочутливість різних біологічних об’єктів коливається в широких межах. Окрім міжвидових, існують й індивідуальні відмінності в радіочутливості, тобто реакція на опромінення індивідів одного виду суттєво відрізняється в межах одних і тих самих дозових навантажень [1].

Узагальнюючи дані численних наукових досліджень, можна визначити головні чинники, що впливають на формування IP людини:

— особливості генотипу окремого організму, що може проявлятися в генетичній схильності до формування патологічної відповіді на дію

генотоксикантів (наявність спадкових синдромів хромосомної нестабільності, поліморфізм генів, що беруть участь у формуванні IP тощо);

— фізіологічний або патофізіологічний стан організму під час опромінення (гормональний статус, наявність хронічних захворювань, вірусної інфекції, фізичних та психологічних навантажень тощо) [2, 3];

— вік та, можливо, стать. Найбільшу радіочутливість виявляють слабодиференційовані тканини плоду, діти, підлітки у порівнянні з дорослим організмом. Однозначних даних щодо радіочутливості осіб різної статі досі немає, але за деякими даними чоловіки є більш радіочутливими, ніж жінки, що автори пов'язують із гормональним статусом організму [4–6].

Очевидно, що гіперчутлива частина популяції страждає раніше за інших від променевої дії, в тому числі в поєднанні з іншими мутагенами навколишнього середовища. Тому оцінка і прогнозування IP організму людини, вивчення механізмів її формування та пошук надійних маркерів має важливе значення для практичного застосування одержаних результатів, зокрема в ділянці нормування радіаційної безпеки та радіаційного захисту населення, променевої терапії онкологічних хворих і, що не менш важливо, для виявлення осіб з підвищеним канцерогенним ризиком, оскільки радіаційно-індукована нестабільність геному є однією з причин розвитку радіогенних пухлин [7].

IP та її зв'язок із нестабільністю геному та схильністю до злоякісних новоутворень людини. Інтенсивне дослідження проблеми IP людини пов'язане перш за все з обстеженням пацієн-

тів із синдромами спадкової хромосомної нестабільності, що є причиною рідкісних ауtosомних захворювань, за яких спостерігається, з одного боку, схильність до формування злоякісних новоутворень, а з іншого — висока чутливість соматичних клітин до радіації та інших генотоксичних агентів [8]. До синдромів хромосомної нестабільності належать атаксія-телангіектазія (AT або синдром Луї-Бар), анемія Фанконі (FA), Блюма (BS), Коккейна (CS), Ніймегенський синдром ламкості хромосом (NBS), атаксія-панцитопенія, прогерія (синдроми Вернера та Хатчінсона-Гілфорда) та інші. Було показано, що генетична схильність до онкопатологій та/або ініціація онкогенезу при цих синдромах зумовлена мутаціями в локусах ДНК, специфічних для кожної патології, та супроводжується високою частотою мутацій і підвищеним рівнем спонтанних аберацій хромосом. При AT — це специфічні мутації в гені *ATM* (*Ataxia-telangiectasia mutated*), що відповідає за розпізнавання розривів ДНК та включення системи "перевірочних точок" клітинного циклу (*cell-cycle checkpoints*), активації репарації ДНК та апоптозу шляхом стабілізації білка p53 [9, 10]. AT — найбільш вивчений на даний час синдром, для якого характерні імунологічні дисфункції, висока схильність до розвитку онкопатологій (насамперед гематологічних) та надзвичайна чутливість до іонізуючої радіації. Показано, що AT-гетерозиготи є також високорадіочутливими, а ризик розвитку РМЗ у цих осіб вище у 4 рази, ніж в контрольній групі [11]. В сучасних експериментальних дослідженнях соматичні клітини хворих на AT використовуються в якості клітинної моделі, надчутливої до дії іонізуючої радіації.

Таблиця 1. Генетичні патології людини, що супроводжуються високою радіаційною чутливістю соматичних клітин

Патологія	Літературне джерело
Апластична анемія	van Diemen, 1997 [14]
Атаксія телангіектазія та АТ — гетерозиготи	Sanford, 1990 [15], Becker-Catania, 2000 [16]
Синдром Блюма	Ellis 1996 [17]
Синдром Дауна та інші трисомії	Баренфельд, 2001 [18]
Синдром базальноклітинного невосу	el-Zein, 1995 [19]
Вроджений дискератоз	Cengiz, 2004 [20]
Анемія Фанконі	Djuzenova, 2001 [21]
Синдром Коккейна	Friedberg, 1996 [22]
Синдром Лі-Фраумені	Mitchell, 1997 [23]
Ніймегенський синдром ламкості хромосом	Howlett, 2006 [24]
Синдром Вернера	Saintigny, 2002 [25]
Пігментна ксеродерма (XP-C, E та гетерозиготи)	Parshad, 1990 [26]
Родинні форми раку	
Гостра мієлобластна лейкемія	Parshad, 1985 [27]
РМЗ	Helzsouer, 1996 [28]
Рак прямої кишки	Baria, 2001 [29]
Ліпосаркома	Parshad, 1985 [27]
Остеосаркома	Parshad, 1985 [27]
Ретинобластома	Chan, 2000 [30]
Злоякісна меланома	Sanford, 1997 [31]
Нефробластома (пухлина Вільямса)	Parshad, 1985 [27]
Спорадичні форми раку	
РМЗ	Scott, 1994 [32]
Рак прямої кишки	Baria, 2001 [29]
Хронічна мієлобластна лейкемія	Parshad, 1985 [27]
Мієлодиспластичні синдроми	Kuramoto, 2002 [33]
Злоякісна меланома	Sanford, 1997 [31]

На основі робіт [12, 13] ми склали табл. 1, в якій перелічено спадкові генетичні синдроми, родинні та спорадичні форми раку, при яких встановлено високу радіаційну чутливість як на рівні організму хворих, так і при опроміненні їх соматичних клітин в умовах *in vitro*.

Заслужують на увагу інтенсивні дослідження IP хворих на рак молочної залози (PM3) [34-36]. Показано, що мутації високопенетрантних генів *BRCA1* та *BRCA2* корелюють із підвищеним ризиком PM3, проте тільки у приблизно 2% хворих на PM3 виявляють мутації одного з генів [37]. Також відомо, що мутації *BRCA1* та *BRCA2* призводять до формування радіочутливого фенотипу клітин людини [38]. В той самий час було виявлено, що близько 40% осіб з групи хворих на спонтанний PM3 мають підвищену радіочутливість нормальних клітин. На основі одержаних результатів припускають, що схильність до PM3 у частини пацієнтів зумовлена мутаціями в генах низької пенетрантності, що відповідають за формування відповіді на пошкодження ДНК [39, 40], а підвищена радіочутливість хромосом лімфоцитів крові може бути потенційним показником генів низької пенетрантності, що зумовлюють схильність до PM3 [41, 42]. Припускається, що це — гени, які відповідають за регуляцію клітинного циклу та інтенсивність процесів репарації, а дефекти в них (спадкові або ж спонтанні) призводять до підвищення радіочутливості хромосом. Цю гіпотезу підтверджує дослідження рівня експресії комплексу *cdk1/cyclin* в лімфоцитах хворих на PM3, який бере участь в ініціації процесів репарації при переході між G2/M

стадіями і, таким чином, впливає на рівень радіаційно-індукованих абераций хроматидного типу [43].

Таким чином, проблема пошуку генетичних детермінант, спільних у формуванні IP та ініціації канцерогенезу, в наші дні привертає особливу увагу науковців. Аналіз багатьох робіт показав, що хромосомна нестабільність, як один з кінцевих результатів реалізації нестабільності геному в цілому — важливий фактор в процесах онкотрансформації клітин. Саме на основі досліджень синдромів хромосомної нестабільності було зроблено припущення про провідну роль генетичної компоненти у формуванні індивідуальних розбіжностей у відповіді хромосом соматичних клітин людини на опромінення [44] та існування зв'язку між радіочутливістю хромосом та схильністю до канцерогенезу [45, 46]. Дана проблема потребує подальшого поглибленого вивчення, оскільки не завжди особи, яким притаманна схильність до злоякісної трансформації, є високорадіочутливими, в той самий час не для всіх відомих генів радіочутливості з'ясовано роль у канцерогенезі [47].

Молекулярно-генетичні основи IP людини. Характеризуючи розвиток поглядів на розуміння механізмів реалізації променевого ураження на клітинному рівні, що є основою формування патофізіологічних наслідків опромінення на рівні організму в цілому, слід зазначити, що впродовж останнього часу він значно змінився. Це перш за все пов'язано з дослідженнями молекулярно-генетичних механізмів радіаційної загибелі клітин. На рис. 1 представлено модифіковану нами схему основних етапів формування відповіді кліти-

ни на опромінення [48, 49]. Згідно з сучасними уявленнями в клітині функціонує своєрідна сигнальна система, яка розпізнає наявність в генетичних та епігенетичних структурах радіаційно-індукованих пошкоджень, забезпечує реалізацію відновлювальних процесів, а в разі їх неефективності дає команду для запуску апоптичної загибелі.

Виходячи з цього, ІР є полігенною та поліфакторіальною за своєю природою, оскільки залежить від ефективності роботи багатьох окремих складових цієї сигнальної системи, що функціонує під генетичним контролем. До

кандидатних генів ІР людини можна віднести, насамперед, гени репарації радіаційно-індукованих пошкоджень ДНК, контролю клітинного циклу та індукції механізмів радіозахисту та детоксикації ксенобіотиків. В табл. 2 представлено перелік відомих на сьогодні генів людини, для яких експериментально доведено або ж очікується прямий зв'язок із формуванням чутливого фенотипу клітин. Серед ґрунтовних літературних оглядів, присвячених ролі окремих з них, зазначимо наступні [50–54]. Припускають, що поліморфізм генів ІР лежить в основі міжіндивідуаль-

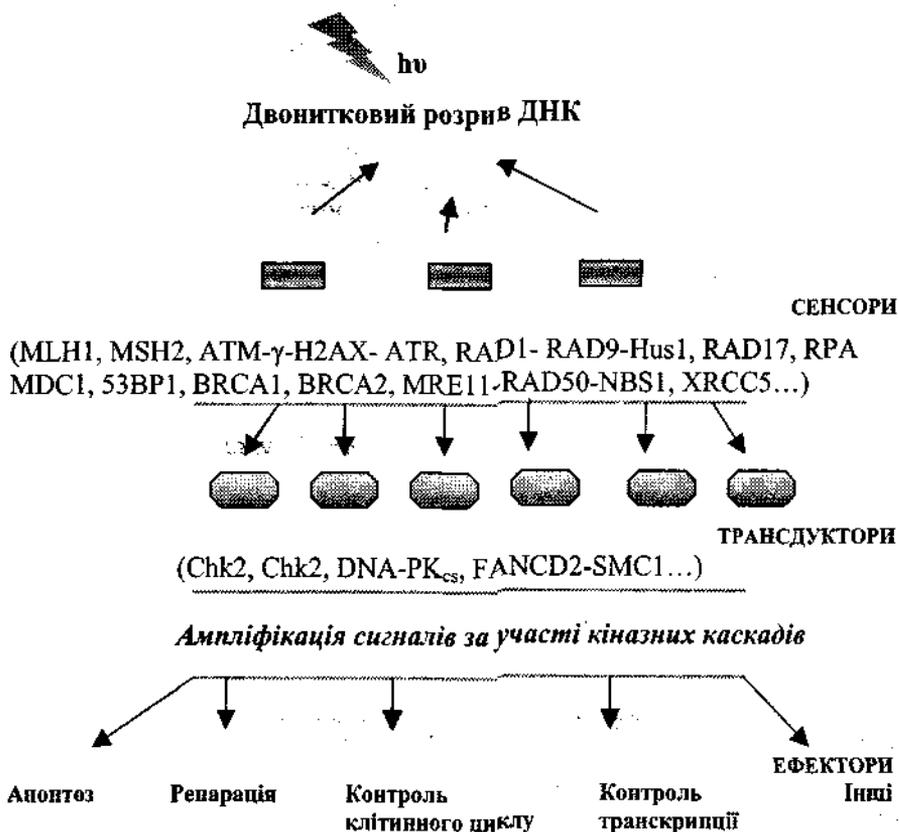


Рисунок 1. Схема клітинної відповіді на формування радіаційно-індукованих двониткових розривів ДНК

них відмінностей в активності специфічних ферментів, які забезпечують здатність клітин до відновлення та розмаїття їх реакцій на дію радіаційного та інших мутагенних, канцерогенних факторів навколишнього середовища. Саме полігенна реакція клітин на дію

радіаційного фактора та поліморфізм генів, що беруть у ній участь, надзвичайно ускладнює пошук специфічних молекулярних маркерів IP організму людини.

Сучасні методичні підходи до оцінки та прогнозування IP. Варіабельність якісних та кількісних реакцій на опро-

Таблиця 2. Кандидатні гени індивідуальної радіочутливості людини

Ген	Функція
<i>Репарація пошкоджень ДНК</i>	
<i>hRAD51</i>	гомологічна рекомбінація, репарація, проліферація
<i>hRAD52</i>	гомологічна рекомбінація, репарація ДР ДНК
<i>XRCC4</i>	репарація ДР ДНК, V(D)J-рекомбінація генів імуноглобулінів
<i>XRCC1</i>	гомологічна рекомбінація, репарація ДР ДНК
<i>XRCC5</i>	гомологічна рекомбінація, репарація ДР ДНК, V(D)J-рекомбінація
<i>XPG</i>	ексцизійна репарація нуклеотидів
<i>XPB</i>	ексцизійна репарація нуклеотидів, кодує одну з субодиниць фактора транскрипції TFIIH
<i>OGG1</i>	ініціація ексцизійної репарації, ідентифікація модифікованих нуклеотидних основ
<i>BRCA1</i>	репарація ДР ДНК, G2/M контроль
<i>BRCA2</i>	репарація ДР ДНК
<i>UG4</i>	гомологічна рекомбінація, V(D)J-рекомбінація, репарація
<i>PRKDC</i>	V(D)J-рекомбінація
<i>DCLRE1</i>	V(D)J-рекомбінація
<i>Контроль клітинного циклу</i>	
<i>TP53</i>	апоптоз
<i>ATM</i>	G2/M контроль, ініціація репарації
<i>ATR</i>	G2/M контроль
<i>Nbs1</i>	контроль S-стадії
<i>NF-kB</i>	фактор транскрипційного контролю
<i>c-jun</i>	транскрипційний фактор
<i>Egr-1</i>	транскрипційний фактор
<i>Інші</i>	
<i>NOS</i>	NO метаболізм
<i>SOD</i>	детоксикація ксенобіотиків
<i>CYP, GST, NAT</i>	детоксикація ксенобіотиків

мінення в класичній радіобіології оцінюється перш за все завдяки побудові залежностей доза-ефект (виживання/загибель) та визначенні таких показників, як $LD_{50/30}$, D_0 . Проте добре відомо, що для кожного організму існує індивідуальна критична доза і такий показник, як $LD_{50/30}$, не відображає строго індивідуальної радіочутливості організму, оскільки стосується абстрактного організму з середніми показниками усієї експериментальної вибірки [1].

Складність вивчення ІР організму зумовило той факт, що довгий час дану проблему розглядали як частину загальнобіологічної проблеми реактивності. З середини минулого століття здійснювалися численні спроби встановити кореляцію між показниками фізіологічного стану і неспецифічної реактивності організму експериментальних тварин та його радіочутливістю [55, 56]. Не применшуючи наукової цінності одержаних експериментальних результатів, слід відмітити, що співставлення різних показників реактивності організму з ІР здійснювалося при опроміненні тварин в дозах, близьких до LD_{50} , при цьому лише декілька досліджень присвячено прогнозуванню ІР при опроміненні в малих дозах [57], а аналіз цих робіт показав, що використані показники не завжди мали високу точність прогнозування ІР організму, були складними для реєстрації. Суттєвим моментом є і те, що більшість запропонованих авторами методичних підходів неможливо застосувати для безпосередньої оцінки і прогнозування ІР людини.

Одна з проблем радіаційної онкології — терапія пацієнтів, високочутливих до опромінення. За різними клініч-

ними спостереженнями, у 20% онкологічних хворих спостерігаються ускладнення у вигляді радіаційно-індукованих реакцій здорових тканин, які можуть бути як гострими, так і віддаленими, а також проявлятися у формуванні вторинних радіоіндукованих пухлин [58, 59]. Ризик ускладнень після опромінення для окремого пацієнта визначається на основі узагальнених даних, характерних для даної групи пацієнтів. Така оцінка не враховує індивідуальних варіацій в радіочутливості. Як наслідок, "стандартна доза" для популяції може бути заниженою для пацієнтів з високою радіорезистентністю пухлини, тоді як ця ж доза може викликати тяжкі ускладнення у пацієнтів з високою ІР нормальних тканин. Моделювання радіотерапевтичних схем показує, що в разі визначення радіочутливих пацієнтів за допомогою прогностичних тестів радіотерапію решти пацієнтів можна було б проводити при значно вищих дозах [60–62].

На основі вивчення спадкових синдромів було зроблено припущення, що чутливість нормальних тканин при радіотерапії зумовлена індивідуальними генетичними особливостями особи і її можна визначати на основі технологій *in vitro* з використанням культур соматичних клітин людини [58, 63]. В радіобіології та експериментальній радіаційній онкології для оцінки відповіді різних клітин на дію іонізуючої радіації широко використовується тест на клоногенну здатність або визначення фракції клітин, що вижили після опромінення в дозі 2 Гр (SF2) [64, 65]. В останні роки багато досліджень присвячено можливості оцінки і прогнозування ІР за допомогою вивчення інтенсив-

ності процесів репарації двониткових розривів ДНК [66], апоптозу [67], активності систем детоксикації ксенобіотиків [68] з використанням різних методичних підходів. Проте, знову ж таки, жоден із запропонованих методів досі не знайшов застосування в онкологічній клініці [69, 70].

Комплексне дослідження молекулярно-генетичних основ формування IP має привести в майбутньому до розробки принципово нових методів оцінки та управління радіочутливістю. Це перш за все методи, пов'язані з вивченням експресії кандидатних генів IP. Сучасні методи вивчення поліморфізму ферментних локусів методом електрофоретичного розподілу білків крові людини та поліморфізму мікросателітних локусів ДНК на основі застосування полімеразної ланцюгової реакції добре зарекомендували себе в дослідженнях чутливості організмів до дії окремих генотоксичних факторів навколишнього середовища, лікарських препаратів. Проте слід констатувати, що сучасні знання про полігенний та поліфакторіальний характер формування IP людини є недостатніми, тому використання молекулярно-генетичних маркерів IP як з методичної, так і фінансової точки зору є вкрай складним завданням.

На нашу думку, один з реальних методичних підходів до об'єктивної кількісної оцінки і прогнозування IP організму людини — дослідження цитогенетичних ефектів, що спостерігаються при тестуючому опроміненні соматичних клітин людини. Такий підхід має ґрунтуватися, перш за все, на наступному:

— індуковані аберації хромосом в соматичних клітинах людини відобра-

жають не тільки дозове променеве навантаження, а й спадкові особливості геному або його нестабільність тощо. При цьому аберації хромосом можна розглядати в якості кінцевого результату реалізації різноманітних механізмів формування індивідуальної клітинної відповіді на опромінення;

— радіочутливість з точки зору генетики є кількісною ознакою, а аберації хромосом є її інформативним і специфічним маркером дії на рівні організму. Так, тест-система лімфоцитів периферичної крові людини з наступним метафазним аналізом аберацій хромосом визнана ВОЗ, МАГАТЕ, НКДАР ООН [71, 72] найкоректнішим біодозиметром і біоіндикатором ступеня променевого ураження організму людини в цілому.

Саме цей методичний підхід був використаний в нашій роботі по вивченню варіабельності цитогенетичних показників в лімфоцитах периферичної крові умовно здорових жителів м. Києва [73]. Застосування тестуючого опромінення в найбільш радіочутливий період мітотичного циклу — постсинтетичний, лежить в основі G_2 -assay, який використовується для дослідження IP хромосом соматичних клітин онкологічних хворих [74]. Розроблена нами цитогенетична схема обстеження умовно здорових осіб, застосування тест-системи лімфоцитів периферичної крові людини, специфічність та інформативність одержаних цитогенетичних показників, а також розроблений статистичний підхід до їх аналізу дозволили серед обстежених виділити групу з підвищеними показниками IP організму людини в цілому [73]. Отримані цитогенетичні дані мають практичне значення для виявлення осіб з

підвищеним ризиком розвитку промєневих реакцій та злєякісних новоутворєнь, що є актуальним в умовах дії факторів чорнобильської катастрофи.

Таким чином, останні світові досягнення в галузі молекулярної та радіаційної генетики роблять суттєвий внесок в розуміння того, які структурні та функціональні зміни в генах лежать в основі формування індивідуальної радіочутливості, а також стимулюють пошук адекватних цитогенетичних критеріїв її оцінки на рівні організму людини в цілому.

Перелік літератури

1. Little J. B., Nove J., Strong L. C. Survival of human diploid skin fibroblasts from normal individuals after X-irradiation // *Int. J. Radiat. Biol.*— 1988.— 54.— P. 899–910.
2. Roberts C. J., Morgan G. R., Danford N. Effects of Hormones on the variation of radiosensitivity of females as measured by induction of chromosomal aberrations // *Environ. Health Perspect.*— 1997.— 105.— Suppl. 6.— P. 1467–1471.
3. Sun Y., Huang Y.-C., Xu Q.-Z., Wang H.-P., Bai B., Sui J.-L., Zhou P. K. HIV-1 Tat depresses DNA-PK_{cs} expression and DNA repair, and sensitizes cells to ionizing radiation // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*— 2006.— 65, No 3.— P. 842–850.
4. Пєлєвина И. И., Алексєнко А. В. Уровєнь спонтаннєх и индукцирєванных облєчениєм цитогенетических поврєждєний в лимфоцитах дєтєй в зависимости от возраста и условий жизни // *Радиация, биология, радиэкология.*— 2001.— 41, № 5.— С. 489–499.
5. Rossner P., Bavorova H., Osadikova D., Svadova E., Sram R. J. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of children as biomarkers of environmental exposure and life style // *Toxicology Letters.*— 2002.— 134.— P. 79–85.
6. Preston R. Children as a sensitive subpopulation for the risk assessment process // *Toxicol. and Applied Pharmacol.*— 2004.— 199.— P. 132–141.
7. Morgan W. F., Day J. P., Kaplan M. I., McGhee E. M., Limoli C. L. Genomic instability induced by ionizing radiation // *Radiat. Res.*— 1996.— 146.— P. 247–258.
8. Darroudi F., Vyas R. C., Vermeulen S., Natarajan A. T. G2 radiosensitivity of cells derived from cancer-prone individuals // *Mutat. Res.*— 1995.— 328.— P. 83–90.
9. Khanna K. K., Lavin M. F., Jackson S. P., Mulhern T. D. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage // *Cell Death Differ.*— 2001.— 8.— P. 1052–1065.
10. Gueven N., Becherel O., Birrell G., Chen Ph., DelSal G., Carney J., Grattan-Smith P., Lavin M. Defective p 53 response and apoptosis associated with an ataxia-telangiectasia-like phenotype // *Cancer Res.*— 2006.— 66, No 6.— P. 2907–2913.
11. Easton D. F. Cancer risks in A-T heterozygotes // *Int. J. Radiat. Biol.*— 1994.— 66.— P. 177–182.
12. Parshad R., Sanford K. Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition // *Crit. Rev. Oncol/Hematol.*— 2001.— 37.— P. 87–96.
13. Scott D. chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer // *Cytogenet genome Res.*— 2004.— 104.— P. 365–370.
14. Van Diemen P. C., Maasdam D., Darouddi F., Natarajan A. T. X-ray sensitivity of lymphocytes of aplastic- and Diamond-Black-fan- anemia patients as detected by conventional cytogenetic and chromosome painting techniques // *Mutat. Res.*— 1997.— 373.— P. 225–235.
15. Sanford K., Parshad R., Price F., Jones G., Tarone R., Eirman L., Hale P., Waldmann T. Enhanced chromatid damage in blood lymphocytes after G2 phase x-irradiation, a marker of the ataxia-telangiectasia gene // *JNCl.*— 1990.— 82, No 12.— P. 1050–1055.
16. Becker-Catania, S. G., Chen, G., Hwang, M. J., Wang, Z., Sun, X., Sanal, O., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., Chessa, L., Lee, E. Y.-H., Gatti, R. A. Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype

- studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity // *Mol. Genet. Metab.*— 2000.— 70.— P. 122–133.
17. *Ellis N. A.* Molecular genetics of Bloom's syndrome // *German J. Hum. Mol. Genet.*— 1996.— 5, Spec. No.— P. 1457–1463.
18. *Баренфельд Л. С.* Синдром Дауна: патогенез, радиорезистентный синтез ДНК и хромосомная нестабильность // *Цитология.*— 2001.— 44, № 4.— С. 379–386.
19. *El-Zein R., Shaw P., Tyring S. K., Au W. W.* Chromosomal radiosensitivity of lymphocytes from skin cancer-prone patients // *Mutat. Res.*— 1995.— 335, No 2.— P. 143–149.
20. *Cengiz M., Celebioglu B., Ozyar E., Atahan L.* Unusual hypersensitivity to radiation therapy in a patient with dyskeratosis congenita syndrome // *Oral Oncol.*— 2004.— 40, No 7.— P. 758–759.
21. *Djuzenova C. S., Rothfuss A., Oppitz U.* Response to X-radiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay // *Lab. Invest.*— 2001.— 81.— P. 185–192.
22. *Friedberg E. C.* Cockayne syndrome — a primary defect in DNA repair, transcription, both or neither? // *BioEssays.*— 1996.— 18.— P. 731–738.
23. *Mitchell E. L., Scott D.* G2 chromosomal radiosensitivity in fibroblasts of ataxia-telangiectasia heterozygotes and Li-Fraumeni syndrome patients with radio-resistant cells // *Int. J. Radiat. Biol.*— 1997.— 72.— P. 435–438.
24. *Howlett N. G., Scuric Z., D'Andrea A., Schiestl R.* Impaired DNA double strand repair in cells from Nijmegen breakage syndrome patients // *DNA Repair.*— 2006.— 5, No 2-3.— P. 251–257.
25. *Saintigny Ya., Makienko K., Swanson C., Emond M.* Homologous recombination resolution defect in Werner syndrome // *Mol. Cellular Biol.*— 2002.— 22, No 20.— P. 6971–6978.
26. *Parshad R., Sanford K., Kreamer K., Jones G., Tarone R.* Carrier detection in xeroderma pigmentosum // *J. Clin. Invest.*— 1990.— 85.— P. 135–138.
27. *Parshad R., Sanford K., Jones G.* Chromosomal radiosensitivity during G2 cell-cycle period of skin fibroblasts from individuals with familial cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1985.— 82.— P. 5400–5403.
28. *Helzsoer K. J., Harris E. L., Parshad R., Perry H. R., Price F. M., Sanford K. K.* DNA repair proficiency: Potential susceptibility factor for breast cancer // *J. Natl. Cancer Inst.*— 1996.— 88.— P. 754–755.
29. *Baria K., Warren C., Roberts S. A., West C. M., Scott D.* Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? // *BJC.*— 2001.— 84, No 7.— P. 892–896.
30. *Chan L. L., Czerniak B. A., Ginsberg L. E.* Radiation-induced osteosarcoma after bilateral childhood retinoblastoma // *Am. J. Roengenol.*— 2000.— 174.— P. 1288–1293.
31. *Sanford K. K., Parshad R., Price F. M., Tarrone R. E., Thompson J., Guerry D.* Radiation-induced chromatid breaks and DNA repair in blood lymphocytes of patients with dysplastic nevi and cutaneous melanoma // *J. Invest. dermatol.*— 1997.— 109.— P. 546–549.
32. *Scott D., Spreadborough A., Levine E., Roberts S. A.* Genetic predisposition in breast cancer // *Lancet.*— 1994.— 344.— P. 1444.
33. *Kuramoto K., Ban S., Oda K., Tanaka H., Kimura A., Suzuki G.* Chromosomal instability and radiosensitivity in myelodysplastic syndrome // *Leukemia.*— 2002.— 16.— P. 2253–2258.
34. *Scott D.* Chromosomal radiosensitivity, cancer predisposition and response to radiotherapy // *Strahlenther. Onkol.*— 2000.— 176, No 5.— P. 229–234.
35. *Bayens A., Van Den Broecke R., Makar A., Thierens H., De Ridder L., Vral A.* Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: influence of age of onset of the disease // *Oncol. Rep.*— 2005.— 13, No 2.— P. 347–353.
36. *Turnbull C., Mirugaesu N., Eeles R.* Radiotherapy and genetic Predisposition to breast cancer // *Clin. Oncol.*— 2006.— 18, No 3.— P. 257–267.

37. Peto J., Collins N., Barfoot R. Prevalence of BRCA1 and BRCA 2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer // *J. Natl. Cancer Inst.*— 1999.— 91.— P. 943–949.
38. Foray N., Randrianarison V., Marot D. et al. Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA 2 // *Oncogene.*— 1999.— 18.— P. 7334–7342.
39. Burill W., Barber J. B. P., Roberts S. A., Bulman B., Scott D. Heritability of chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a pilot study with lymphocyte micronucleous assay // *Int. J. Radiat. Biol.*— 2000.— 76.— P. 1617–1619.
40. Bayens A., Thierens H., Claes K., Poppe B., De Ridder L., Vral A. Chromosomal radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers // *Int. J. Radiat. Biol.*— 2004.— 80, No 10.— P. 745–756.
41. Roberts S. A., Levine E. L., Scott D. Influence of intrinsic radiosensitivity on the survival of breast cancer patients // *Int. J. Radiat. Biol.*— 2003.— 79, No 5.— P. 311–317.
42. Riches A. C., Bryant P. E., Steel C. M., Gleig A., Robertson A. J., Preece P. E., Thompson A.M. Chromosomal radiosensitivity in G2-phase lymphocytes identifies breast cancer patients with distinctive tumour characteristics // *Br. J. Cancer.*— 2001.— 85, No 8.— P. 1157–1161.
43. Terzoudi G. I., Jung T., Hain J., Vrouvas J., Margaritis K., Donta-Bakoylanni C., Makropoulos V., Angelakis P. H., Pantelias G. E. Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: the role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved // *Int. J. Radiat. Biol.*— 2000.— 76.— P. 607–615.
44. Gatti R. A. The inherited basis of human radiosensitivity // *Acta Oncol.*— 2001.— 40.— P. 702–711.
45. Shadan F. F., Koziol J. Induced genome instability as a potential screening test for cancer susceptibility? // *Med. Hypoth.*— 2000.— 55, No 1.— P.69–72.
46. Van Gent D. C., Hoeymakers J., Kannar R. Chromosomal instability and the Dna double-stranded break connection // *Nature Rev. Genetics.*— 2001.— 2.— P.196–206.
47. Leong T., Borg M., McKay M. Clinical and cellular radiosensitivity in inherited human syndromes // *Clinical Oncol.*— 2004.— 16.— P. 206–209.
48. Khanna K. K., Jackson S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection // *Nature Genetics.*— 2001.— 27.— P. 247–254.
49. Rothkamm K., Kruger I., Thompson L. H., Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle // *Mol. Cell Biol.*— 2003.— 23.— P. 5706–5715.
50. Jones I. M., Thomas C. B., Xi T., Nelson D. O., Mohrenweiser H. W. The genetic basis for variation in radiation sensitivity in the general population // *Radiat. Res.*— 2005.— 163, No 6.— P.700–701.
51. Cuddihy A. R., Bristow R. G. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? // *Cancer and Metastasis Reviews Issue.*— 2004.— 23 (3-4), No 3-4 — P.237–257.
52. Fei P., El-Deiry W. p53 and radiation responses // *Oncogene.*— 2003.— 22.— P. 5774–5783.
53. Fernet M., Hall J. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity // *DNA Repair.*— 2004.— 3, No 8-9.— P. 1237–1243.
54. Andreassen C. N., Alsner J., Overgaard M., Overgaard J. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes // *Radiat. Oncol.*— 2003.— 69, No 2.— P. 127–135.
55. Григорьев А. Ю. Индивидуальная радиочувствительность. М.: Энергоатомиздат, 1991.— 80 с.
56. Даренская Н. Г., Стяжкина Т. В. Хаймович Т. И. Вероятностные зависимости прогнозируемых критериев радиочувствительности от величины исходных параметров реактивности ЦНС // *Бюл. радиац. медицины. Сообщение 3. М.— 1991.— С. 71–77.*

57. Афонина Г. Б., Яценко В. П., Минченко Ж. Н., Белый А. В., Русин Е. В., Марушко Ю. В. Прогноз індивідуальної радіочувствительності к низким дозам іонізуючого облучення // Доповіді Нац. акад. наук України.— 1999.— 3.— С.163–167.
58. Brock W.A. Predicting normal tissue response to radiotherapy // *Int. J. Radiat. Biol. Phys.*— 1999.— 43, No 3.— P. 473–474.
59. Wang W. D., Chen Z. T., Li D. Z., Cao Z. H., Chen X. P. Detecting normal cell radiosensitivity via assay of DNA damage in lymphocytes for individualizing radiotherapy in head and neck cancer patients // *Oncology.*— 2005.— 69, No 3.— P. 208–213.
60. Burnet, N. G., Nyman, J., Turesson, I., Wurm, R., Yarnold, J. R., and Peacock, J. H. The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualizing radiotherapy schedules // *Radiother. Oncol.*— 1994.— 33.— P. 228–238.
61. Marples B., Greco O., Joiner M. L., Scott S. D. Radiogenetic therapy: strategies to overcome tumor resistance // *Curr. Pharm. Des.*— 2003.— 9.— P. 2105–2112.
62. Bourguignon M. H., Gisoni P. A., Perez M. R., Michelin S., Dubner D., Giorgio M. D., Carosella E. D. Genetic and epigenetic features in radiation sensitivity. Part II: Implications for clinical practice and radiation protection // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.*— 2005.— 32, No 3.— P. 351–368.
63. Alapetite C., Cosset J. M., Bourguignon M. H., Masse R. Genetic susceptibility to radiations. Which impact on medical practice? // *Q. J. Nucl. Med.*— 2005.— 44, No 4.— P. 347–354.
64. Bristow R. G., Hardy P. A., Hill R. P. Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse of murine tumor cell lines. I: Parameters of in vitro radiosensitivity and endogenous cellular glutathione levels // *Int. J. Oncol. Biol. Phys.*— 1990.— 18, No 1.— P. 133–145.
65. Tam K. F., Ng T. Y., Liu S. S., Tsang P. C., Kwong P. W., Ngan H. Y. Potential application of the ATP cell viability assay in the measurement of intrinsic radiosensitivity in cervical cancer // *Gynecol. Oncol.*— 2005.— 96, No 3.— P. 765–770.
66. Almodovar M., Guirado D., Nunez I., Lopez E., Guerrero R., Valenzuela T., Villalobos M., del Moral R. Individualization if radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity // *Radiother. Oncol.*— 2002.— 62, No 3.— P. 327–333.
67. Barber J. B., West C. M., Kiltie A. E., Roberts S. A., Scott D. Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy // *Radiat. Res.*— 2000.— 153.— P. 570–578.
68. Pajovic S. B., Joksic G., Kasapovich J., Pejic S., Kanazir D. T. Role of antioxidant enzymes in radiosensitivity of human blood cells // *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*— 2000.— 19, No 4.— P. 325–331.
69. Peters L., McKay M. Predictive assays: will they ever have a role in the clinic? // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*— 2001.— 49.— P. 501–504.
70. Dikomey E., Borgmann K., Peacock J., Jung H. Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*— 2003.— 56.— P. 1194–1200.
71. *Руководство по изучению генетических эффектов в популяциях человека. Гигиенические критерии состояния окружающей среды.*— Женева: ВОЗ, 1989.— Вып. 46.— 122 с.
72. *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment / Technical Report series No 405.*— Int. Atom. Energy Agency, Vienna: 2001.— 138 p.
73. Дьоміна Е. А., Рябченко Н. М. Оцінка індивідуальної радіочутливості умовно здорово-

вих осіб на основі розробленої схеми цитогенетичного обстеження // Лаб. діагностика.— 2006.— № 2 (36).— С. 30–34.

74. Scott D., Barber J.B., Spreadborough A. R., Burrill W., Roberts S. A. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparisson of two assays // *Int. J. Radiat. Biol.*— 1999.— 75.— P. 1–10.

Представлено Л. Л. Лукаш
Надійшла 21.10.2006

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Н.Н. Рябченко¹, Э.А. Демина¹,
И.Р. Барыляк²

¹Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины
Украина, 03022, Киев,
ул. Васильковская, 45

²Научный центр радиационной медицины
АМН Украины
Украина, 04050, Киев, ул. Мельникова, 53

Кратко изложены молекулярно-генетические основы формирования индивидуальной радиочувствительности человека. Систематизированы данные литературы в отношении основных этапов формирования

ответа клетки на лучевое воздействие, кандидатных генов радиочувствительности и современных методических, а именно — цитогенетических, аспектов в ее оценке и прогнозировании.

Ключевые слова: радиочувствительность, нестабильность генома, aberrации хромосом, цитогенетическое обследование.

MOLECULAR AND GENETIC MECHANISMS OF HUMAN RADIOSENSITIVITY FORMATION

N. M. Ryabchenko¹, E.A. Dyomina¹,
I.R. Barilyak²

¹R. E. Kavetskyi Institute of Experimental
Pathology,

Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine
45 Vasytkivska str., 03022, Kyiv, Ukraine

²Research Centre for Radiation Medicine,
AMS of Ukraine,
53 Melnikova str., 04050, Kyiv, Ukraine

Molecular and genetic bases of formation of human individual radiosensitivity are briefly stated. Literature data concerning the basic stages of cell response to radiation, genes involved in the radiosensitivity formation and modern methods, namely cytogenetic, of its estimation and forecasting are systemized.

Key words: radiosensitivity, genome instability, chromosomal aberrations, cytogenetic examination.

УДК 575.22 + 632.118.3 + 581.57

СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Ю. В. ШИЛИНА¹, С. А. МАМЕДЛИ², Н. М. РАШИДОВ¹

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, Киев, 01143, ул. Акад. Заболотного, 148;
e-mail: lowdose2004@yahoo.com

²Институт радиационных проблем НАН Азербайджана,
Азербайджан, Баку, проспект Г. Джавида, 31а

Рассмотрены основные формы и механизмы спонтанной и индуцированной генетической нестабильности у растений. Отмечено, что индуцированная генетическая нестабильность имеет видоспецифические характеристики, что отражает особенности формирования данного вида в процессе эволюции. Ключевые слова: растения, генетическая нестабильность, эпигенетическая изменчивость, адаптация, ионизирующее излучение.

Высшие растения, в отличие от других организмов, "прикреплены" к месту своего произрастания и не могут его поменять даже при самых неблагоприятных изменениях условий окружающей среды. Видимо поэтому у них выработались эффективные механизмы защиты от действия стрессоров. Одним из главных механизмов защиты растений от действия различных стрессовых факторов, реализующихся на организменном и популяционном уровнях, является высокая пластичность генома [1–3]. Так, усиление геномной изменчивости (нестабильности) у растений отмечается при ухудшении условий произрастания, неоптимальных температурах, засолении, засухе, вирусных и бактериальных инфекциях, высушивании и старении семян, механических повреждениях и других воздействиях.

Генетическая нестабильность проявляется в увеличении скорости (частоты) формирования изменений в геноме, которые возникают как спонтанно, так и под влиянием различных факторов. При этом мутации могут возникать не сразу после воздействия стресс-фактора, а после десятков циклов репликации (реплицирующаяся нестабильность) [4–6]. По некоторым данным, до половины всех мутаций может проявляться в форме реплицирующейся нестабильности [4].

© Ю. В. ШИЛИНА, С. А. МАМЕДЛИ, Н. М. РАШИДОВ, 2006

В результате стимуляции генетической нестабильности изменяется генетическая структура популяций, возрастает их гетерогенность по различным признакам. Возрастание генетической нестабильности имеет неоднозначное значение: может происходить как снижение жизнеспособности отдельных индивидов, так и повышение их устойчивости к повреждающим факторам, что создает базу для последующего отбора соответствующих индивидов при достаточной мощности и продолжительности действия стрессора. Это создает основу для адаптации — процесса повышения приспособленности к измененным условиям существования и возрастанию устойчивости к действию различных стрессовых факторов. В этом случае повышение частоты мутирования и других геномных перестроек имеет приспособительное значение и адаптивность популяций, их устойчивость и надежность в определенных пределах возрастают пропорционально степени генетической изменчивости. Если у животных и человека представления об отрицательной роли генетической нестабильности для организмов основываются на факте значимого вклада генетической нестабильности в процесс злокачественной трансформации клеток, то у растений и микроорганизмов более очевидно ее адаптивное значение.

Изучение закономерностей генетической нестабильности у растений имеет важное фундаментальное и прикладное значение, в частности для прогнозирования отдаленных последствий воздействия генотоксических факторов на различные виды растений при сохранении их генофонда. Возможно

также использование растений с известными характеристиками геномной нестабильности в качестве тест-систем для оценки генетических последствий радионуклидного загрязнения и других стрессовых факторов, проведения мониторинга природных экосистем на больших территориях в зонах экологических катастроф; оценки экологических рисков; получение новых форм в селекции.

Целью нашей работы было рассмотрение существующих форм генетической нестабильности у перекрестноопыляющихся растений в норме и при стрессовых воздействиях, выявление основных характеристик и закономерностей ее проявления, возможных механизмов, а также значения феномена генетической нестабильности для растений на разных уровнях организации (молекулярном, клеточном, организменном и популяционном).

Формы генетической нестабильности у растений. *Спонтанная и индуцированная генетическая нестабильность.* Различают спонтанную и индуцированную генетическую нестабильность. Для генетической нестабильности характерна прежде всего повышенная частота мутирования отдельных генов. Как известно, спонтанная частота мутаций для различных генов неодинакова и колеблется в пределах от 10^{-2} до 10^{-10} на ген за поколение. Спонтанная генетическая нестабильность проявляется в перманентной повышенной изменчивости отдельных участков генома, которая проявляется спонтанно, без видимых внешних воздействий.

К проявлениям генетической нестабильности относят [2, 6–12]: наличие

нестабильных генов, для которых характерна повышенная частота мутаций; изменения, происходящие с частотой, превышающей среднюю частоту спонтанных мутаций, и не связанные с рекомбинацией при половом процессе; транспозицию мобильных генетических элементов (МГЭ); мигрирующие детерминанты типов спаривания; генетическую нестабильность, подобную гибридному дисгенезу у *Drosophila*, когда цитоплазматические факторы влияют на непостоянство генома; повышение частоты различных типов мутаций в поколениях клеток, включая дестабилизацию, изменение числа и морфологии хромосом; увеличение выхода хромосомных aberrаций; изменения пloidности (анеу- и полиплоидия); образование микроядер; генные мутации (образование точковых мутаций, особенно затрагивающих регуляторные гены); дубликации и амплификации определенных локусов (генов); амплификации и делеции повторов ДНК, микросателлитная нестабильность; повышение частоты рекомбинационных событий (в частности, сестринских хроматидных обменов), соматического кроссинговера; неравный кроссинговер; модификацию эпигенотипа (репрессия и дерепрессия генов); изменения клеточного гомеостаза.

Под индуцированной нестабильностью генома подразумевают возрастание темпов спонтанного мутагенеза при воздействии различных стрессовых факторов (ионизирующее излучение, УФ, химические соединения, неоптимальные температуры и другие). Радиационно-индуцированная генетическая нестабильность — одна из форм общей генетической нестабиль-

ности, проявляющаяся в ответ на действие радиационного фактора. Она выражается в повышении частоты мутаций, хромосомных aberrаций, prolonged клеточной гибели у потомков облученных клеток [6, 12, 13]. Генетическая нестабильность, индуцированная ионизирующей радиацией, как и спонтанная изменчивость, характеризуется локусной специфичностью, т.е. обусловленное облучением увеличение вероятности возникновения мутаций в разных локусах неодинаково [14]. При изучении действия повышенных доз хронического облучения на геном животных было показано, что облучение не приводит к появлению качественно новых характеристик мутационных спектров, а только проявляет видоспецифичность характеристик таких спектров, повышенную нестабильность которых наблюдали у животных из чистых зон [15].

Существующая концепция непостоянства генома рассматривает механизмы перестройки хроматина как обеспечивающие адаптивно-эволюционные процессы, направленные на приспособление вида к изменяющимся условиям внешней среды [7]. Для эффективной адаптации необходимы механизмы генерации неодинаковой стабильности различных участков генома. Перестройки будут возникать, прежде всего, в генах, связанных с адаптацией к изменяющимся условиям среды (например, в генах, функции которых связаны с распознаванием чужеродной генетической информации, определяющих процессы взаимодействия в системе хозяин — патоген, устойчивости к различным химическим соединениям), вследствие их ес-

тественной нестабильности, связанной с особенностями структуры и функциональной активности. Например, установлено, что гены устойчивости растений (R-гены) мутируют с высокой частотой. К механизмам возникновения значительного разнообразия R-генов относят генные конверсии, неравный кроссинговер, транспозонный мутагенез [16]. Показано, что воздействие гамма-излучения значительно увеличивало частоту их мутирования. Например, после облучения было выявлено до 2,3% мутантов ячменя, устойчивых к мучнистой росе (в контроле — 0,7%), около 2,7% мутантов льна, устойчивых к ржавчине, и 0,1% устойчивых к периколяриозу мутантов риса [16]. Вследствие высокого уровня изменчивости генов устойчивости им свойственны множественность и полиморфизм, что является важным адаптационным механизмом у растений [17, 18].

Проявления радиационно-индуцированной генетической нестабильности у растений. Для растений характерны проявления различных видов генетической нестабильности при облучении.

Генные мутации. Пигментные мутации принадлежат к классу легко обнаруживаемых и хорошо изученных мутаций у высших растений. Хлорофильные мутации являются важным показателем воздействия различных мутагенов на растения, классическим критерием при оценке эффективности мутагенного действия ионизирующего излучения. Повышенная частота хлорофильных мутаций в ряду поколений можно рассматривать как проявление индуцированной нестабильности генома. Мутации, блокирующие синтез

хлорофилла, относятся к классу генных рецессивных мутаций и легче выявляются у растений-самоопылителей, хотя их проявление можно наблюдать и у перекрестноопыляющихся растений. Отмечено, что в хронически облучаемых популяциях растений частота хлорофильных мутаций существенно возрастает и остается на постоянном высоком уровне в течение десятилетий [19]. В популяциях василька шероховатого *Centaurea scabiosa*, произрастающих на территории Восточно-Уральского радиоактивного следа, спустя 38 лет после аварии наблюдали повышенный уровень хлорофильных мутаций типа *albina* и *xantha*, форм с повышенным уровнем содержания антоциановых пигментов, а также хромосомных aberrаций [20].

Кроме повышения частоты хлорофильных мутаций и хромосомных aberrаций у растений *C. scabiosa*, произрастающих на протяжении многих поколений в условиях радионуклидного загрязнения, наблюдали возрастание проявления редких аллельных вариантов локуса лейцинаминопептидазы *Lar* приблизительно на порядок (на ранних стадиях онтогенеза с их последующей элиминацией) [20]. При анализе гибридов томатов в M_2 были обнаружены достоверные отклонения в сторону увеличения растений с рецессивными маркерными генами в опытных популяциях в условиях повышенного загрязнения почвы ^{137}Cs , по сравнению с контрольными популяциями [21]. Против редких аллелей в популяциях растений действует мощный отбор, и снижение частоты редких аллелей более выражено в хронически облучаемых популяциях [19, 20].

В исследованиях на животных (крупный рогатый скот, мыши), подвергавшихся хроническому облучению (как и при действии других стрессоров), показано, что преимущество для воспроизводства получают менее специализированные формы, которые характеризуются большей устойчивостью [15]. Не исключено, что те же тенденции могут иметь место и для растительных форм, особенно сортовых культур и сложных гибридов.

Изменения кариотипа и хромосомный полиморфизм. Дестабилизация хромосом — один из основных признаков общей нестабильности генома [7]. Хромосомный полиморфизм (изменчивость коадаптированных комплексов генов) — особая форма генетической изменчивости, и этот полиморфизм в ряде случаев позволяет популяции более эффективно использовать изменчивость для приспособления к изменяющимся условиям внешней среды. Наряду с эффектом видового постоянства числа хромосом широко известна изменчивость их числа в онтогенезе, обнаруженная в ряде случаев в меристематических тканях [1].

У многих видов эукариот — растений, насекомых, полихет, фитопатогенных грибов в норме выявлен высокий внутривидовой полиморфизм по количеству и размерам хромосом [10, 23, 24, 83]. Добавочные В-хромосомы выявлены у представителей около 800 видов разных семейств растений, в частности у василька шероховатого *Centaurea scabiosa* L., разных видов креписа — *Crepis sibirica*, *C. scabiosa*, овсяницы луговой *Festuca pratensis*, ежи сборной *D. glomerata*, ржи, кукурузы, различных представителей се-

мейства бобовых (*Lotus*, *Medicago*, *Vicia* и др.), лилейных (*Allium*, *Lilium* и др.) [1, 25, 26, 92, 84]. В зависимости от местообитания и условий произрастания изменяется частота встречаемости растений с В-хромосомами. В популяциях, находящихся в сходных экологических условиях, отмечается сходство по частоте встречаемости и типу В-хромосом [25]. Встречаемость растений с В-хромосомами в природных популяциях возрастает, как правило, при неблагоприятных условиях произрастания, а в популяциях, произрастающих в наиболее благоприятных условиях для данного вида, В-хромосомы отсутствуют или встречаются у единичных растений [1]. По мере удаления от оптимальных условий произрастания частота встречаемости растений с В-хромосомами увеличивается, достигая у *C. sibirica* около 28,3%, *C. scabiosa* — 80,4%, *F. pratensis* — 44,5%, *D. glomerata* — до 25,0%, что сопровождается увеличением разнообразия кариотипа, обусловленного числом, типом и размерами В-хромосом [26]. В зависимости от среднегодовой температуры и температуры вегетации в следующем поколении отмечались изменения частоты растений *C. scabiosa* с В-хромосомами (порядка 23–69%) и колебания числа В-хромосом на растение от 1–2 до 1–4, что рассматривается в качестве свидетельства селективного значения В-хромосом [25]. Появление кариотипов с добавочной измененной хромосомой было зафиксировано у проростков *Crepis tenctorum*, выросших из семян растений, произраставших в течение ряда лет в зоне радионуклидного загрязнения ЧАЭС [22, 75].

Предполагают, что В-хромосомы образуются из участков (фрагментов) А-хромосом путем ряда преобразований, включая процессы дупликации [1, 82]. От хромосом основного набора они отличаются более мелкими размерами, хуже окрашиваются при цитологических исследованиях, более гетерохроматизированы, их число непостоянно и может отличаться не только у отдельных растений, но и в разных тканях и клетках одного организма [1].

Добавочным хромосомам приписывается большая роль в адаптации популяций различных организмов [23]. Формирование полиморфной системы В-хромосом в процессе эволюции способствует увеличению экологической пластичности организмов, и этим можно объяснить наличие В-хромосом у значительного числа видов [26]. Установлено, что В-хромосомы увеличивают частоту мутаций в А-хромосомах основного набора, повышая частоту хиазм в А-хромосомах, способствуя межклеточным хромосомным миграциям (цитомиксису), что ведет к повышению рекомбиногенной изменчивости, изменению числа хромосом в клетках и увеличению полиморфизма в клеточных популяциях [1, 23].

Таким образом, у растений наблюдаются проявления разных форм индуцированной нестабильности генома (генные мутации, изменения хромосом), в основе которых могут лежать различные механизмы.

Генетические механизмы формирования спонтанной и радиационно-индуцированной генетической нестабильности растений. Среди возможных механизмов, лежащих в основе спонтанной и индуцированной

генетической нестабильности у растений, следует выделить возрастание частоты рекомбинационных событий разных типов, дестабилизацию повторяющихся последовательностей ДНК, ошибки репарации ДНК, интенсификацию перемещений МГЭ.

Рекомбинации. Генетическая рекомбинация во всем многообразии ее форм и механизмов является одним из главных факторов нестабильности генома [11]. В геномах растений имеют место различные формы генетической рекомбинации — законная (гомологичная), незаконная (с участием МГЭ) и сайт-специфическая. Одной из форм рекомбинации является неравный кроссинговер. Этот процесс зависит от влияния эндогенных и экзогенных факторов и может обеспечивать наследственные изменения, имеющие приспособительное значение. Явление неравного кроссинговера в предшествующих половым соматических клетках растений рассматривают в качестве приспособительного механизма при изменении условий среды.

Влияние внешних условий на рекомбинационный процесс и возрастание частоты рекомбинаций давно известен. Указывают на важную роль рекомбинационных процессов в увеличении изменчивости, наблюдаемой в условиях хронического облучения [27]. Показано повышение частоты соматической гомологичной рекомбинации ДНК у растений арабидопсиса и табака под воздействием УФ-Б-излучения [28]. Повышение частоты рекомбинаций имело дозозависимый характер и коррелировало с содержанием циклобутановых пиримидиновых димеров [28]. Инфицирование растений табака

вирусным патогеном обуславливает локальную и системную индукцию гомологичной рекомбинации в растительных клетках [29]. Значимые уровни повышения частоты гомологичной рекомбинации у табака наблюдались также при действии факторов, стимулирующих образование свободных радикалов — УФ-С и химического мутагена "rose Bengal" (RB) [29]. Эта стимуляция рекомбинации имела как локальный, так и системный характер (отмечалась в необработанных тканях растений).

Рекомбинационные события часто связаны с повторяющимися последовательностями ДНК, которые диспергированы в геномах и могут выступать в качестве своего рода "горячих точек" для рекомбинационных событий, обуславливая внутривидовую фенотипическую и генетическую гетерогенность микроорганизмов, способствующую их выживанию и адаптации.

Роль повторов ДНК в геномной нестабильности. Первичные детерминанты, лежащие в основе перестройки структуры хромосомы — повторяющиеся последовательности ДНК — описаны как у прокариот, так и у эукариот [30, 31]. Повторяющиеся последовательности ДНК являются наиболее вариабельной фракцией генома, которая составляет его существенную долю. Высокое содержание повторов в геномах высших растений отличает их от высших животных, у которых большую часть генома составляет малокопийная ДНК. Содержание повторяющихся последовательностей в геномах некоторых организмов может достигать 90%, например, у злаков — около 70–75% генома, в частности гексаплоидный ге-

ном пшеницы *Triticum aestivum* содержит более 80% повторяющихся последовательностей [32, 33, 80].

Микросателлиты — тандемы повторяющихся локусов (обычно их величина 0,5–3,0 кб с повторяющимися единицами 6–100 пн). В геномах присутствуют тысячи микросателлитов, которые локализуются, главным образом, на концах хромосом [6]. Микросателлиты широко распространены в растительных геномах и образуют нестабильные регионы, в которых мутационные изменения происходят с намного большей частотой, чем в последовательностях, не содержащих повторов [34]. Мутационные события в микросателлитных локусах отличаются от мутаций структурных генов по механизмам возникновения (изменения длины фрагментов путем изменения количества копий повторов — делеции, инсерции повторяющихся единиц, нуклеотидные замены в структурных генах) и частотой спонтанного возникновения мутаций (частота спонтанных мутационных событий составляет приблизительно 10^{-6} на структурный ген за поколение и $(0,9-7) \cdot 10^{-3}$ в разных локусах для мини-сателлитов) [15, 34]. Последовательности мини- и макросателлитов, рассеянные по геному и характеризующиеся высоким уровнем природной вариабельности и специфичностью у отдельных индивидов, обуславливают изменения за счет гомологичной рекомбинации, неравного кроссинговера, ошибок полимеразы, репарационных процессов, хромосомных перестановок, делеций встраиваемых последовательностей, повышая тем самым нестабильность генома [15, 30, 31, 35]. У эукариотов повторы ДНК

редко ассоциированы с кодирующими регионами генома и локализуются в основном в экстрагенных областях [31].

Повторяющиеся последовательности ДНК облегчают возникновение дупликаций и амплификаций достаточно протяженных районов генома и этот процесс может носить адаптивный характер [11]. Гены устойчивости растений, для которых характерны множественность и полиморфизм, расположены на хромосомах неслучайно и часто образуют группы сцепления, и их локусы состоят из тандемно дублированных генов [16]. Возникновение кластеров сцепленных генов, структурно и функционально сходных, обуславливается внутри- или межмолекулярными обментами участков ДНК, имеющих внутри или по краям прямые или инвертированные повторяющиеся последовательности (эктопической рекомбинацией, приводящей к неравному кроссинговеру) [16]. Геном растений отличается от генома животных тем, что большинство структурных генов растений не являются уникальными, а имеют несколько копий [32]. Возможно, это является также одной из причин высокой радиостойкости растений.

Стрессовые факторы, в частности введение клеток в культуру, облучение, увеличивают изменчивость последовательностей ДНК, содержащих повторы.

Неслучайное распределение повторяющихся последовательностей в геномах, их гипервариабельные свойства позволяют сконцентрировать изменчивость в определенных локусах генома, перестройки в которых могут иметь адаптивное значение, регулируя в определенных пределах частоту и направленность изменчивости.

Анализ отсеквенированных геномов филогенетически отдаленных организмов (представителей нематод, насекомых, высших цветковых растений, дрожжей, а также человека) показал, что большинство повторяющихся последовательностей ДНК у разных организмов представлено активными или дегенеративными копиями транспозонов [36].

Мобильные генетические элементы (МГЭ). Одной из причин дестабилизации генотипа могут быть транспозиции МГЭ, играющие большую роль в процессах адаптации организмов к быстро изменяющимся условиям окружающей среды [36-38]. Большинство геномов растений содержит значительное количество МГЭ или последовательностей, являющихся их производными [39, 40]. Часто на долю транспозонов приходится более 50% содержания ядерной ДНК растений, и такие соотношения, как полагают, сформировались за последние несколько миллионов лет [41].

Все МГЭ принадлежат к 3 классам, различающимся структурой и механизмами передачи: 1) элементы с репликативным механизмом транспозиции, I класса (сопряженный с локальной репликацией, когда в новый сайт переносится копия (ДНК-интермедиат) соответствующего IS- или Tn-элемента); 2) элементы с конститутивным (нерепликативным) типом транспозиции, II класса (транспозиция происходит с вырезанием МГЭ из донорского сайта с последующим внедрением в новый сайт с образованием в донорском репликоне двойного разрыва ДНК); 3) ретротранспозиция (транспозиция ретротранспозонов осуществляется

через обратную транскрипцию РНК-интермедиата с помощью обратной транскриптазы и переносом ДНК-копий в геноме хозяина с помощью кодируемой самими элементами интегразы — LTR-элементы, имеющие на концах длинные прямые повторы). Некоторые транспозоны в зависимости от условий способны использовать, по-видимому, варианты перемещения, свойственные элементам как I, так и II классов [42, 43].

Особенно широко распространены у растений ретротранспозоны и транспозоны II класса, которые, как полагают, играют важную роль в эволюции растительных геномов [44, 45]. Некоторые из ретроэлементов представлены большим количеством копий на геном (от 100 до 10000), тогда как другие имеют даже однокопийные последовательности, но могут мультиплицироваться при стрессовых условиях до количества 10–100 копий [44]. Ретротранспозоны растений сходны с ретротранспозонами других эукариотических организмов, но существуют отличия в геномной организации ретротранспозонов у растений, в частности их высококопийность, значительная гетерогенность и дисперсное распределение в хромосомах [41].

Отмечено, что МГЭ распределяются в геноме неслучайно, существуют сайты их предпочтительной локализации. Растительным геномам свойственна дифференциация регионов, содержащих преимущественно структурные гены или обогащенных транспозонами [46]. Различные представители МГЭ проявляют специфическое предпочтение к определенным участкам хромосом. Например, локализа-

ция высокогетерогенных ретроэлементов группы *Ty-soria*, которые встречаются у различных представителей двудольных и однодольных растений (картофеля *Solanum tuberosum*, бобов *Vicia faba*, вики *Vicia melanops* и *V. sativa*, ячменя *Hordeum vulgare*, ржи *Secale cereale*, лука *Allium cepa*), связана преимущественно с районами эухроматина, хотя у *A. cepa* отмечена их концентрация в терминальном гетерохроматине [49]. Для большинства МГЭ растений характерна тенденция к локализации в межгенных областях, где они могут образовывать кластеры последовательностей [46]. Отмечено, что межгенные последовательности характеризуются значительным уровнем дивергенции и высокой частотой инсерций, делеций и точковых мутаций [47].

Влияние МГЭ имеет характер мутаций, например мутации типа *ваху* у кукурузы, мутации *А*-генов [40]. Большинство спонтанных мутаций, проявляющихся в вариациях окраски цветков ипомеи, обусловлены инсерциями МГЭ в гены, определяющие антоциановую пигментацию цветков, хотя изменения окраски цветков могут обуславливаться не только эксцизиями транспозонов, но и метилированием ДНК в области промоторов генов, определяющих пигментацию цветков [50].

Предполагают, что как генетическая, так и эпигенетическая регуляция играют важную роль в детерминировании частоты и времени эксцизии транспозонов [50]. Транспозиция может контролироваться через регуляцию экспрессии генов организма-хозяина и самого транспозона (ауторегуляция) [51, 52]. Экспрессия промоторов МГЭ на-

ходится под влиянием разных *cis*-активных последовательностей в зависимости от сайта инсерции транспозона в геноме хозяина (соседних энхансеров) [52]. Установлено, что позиционный эффект эксцизии *Tam3* львиного зева определяется степенью метилирования ДНК концевых регионов этого элемента (при увеличении метилирования эксцизионная активность супрессируется), которая зависит также от положения *Tam3* в хромосоме [45].

Известно, что различные стрессоры (изменения температуры, различные излучения, воздействие тяжелых металлов, химических соединений, внедрение патогенов и воздействие их элиситоров, генетические факторы — изогенизация, аутбридинг, инбридинг) индуцируют массовые эксцизии и транспозиции МГЭ [36, 37, 39, 44, 45, 53–56]. Как известно, транспозиции МГЭ могут обуславливать большую часть нестабильных мутаций с высокой частотой возврата к исходному фенотипу [11]. В опытах с львиным зевом было показано, что при возрастании дозы облучения увеличивалась частота соматических мутаций, определяемых по числу пятен на лепестках цветков, отличающихся от основной расцветки, а после прекращения облучения могло наступать восстановление исходной окраски [57]. Избыточное накопление антоцианов у растений, которое отмечается при хроническом облучении и считается индикаторной реакцией растений на облучение, может также быть связано с функционированием МГЭ.

Индукция массовых транспозиций МГЭ в условиях стресса может быть связана с функционированием SOS-

системы репарации, на что указывает, в частности, стимуляция транспозиции МГЭ у растений при действии ДНК-повреждающих агентов (митомicina C), индуцирующих SOS-ответ у бактерий, и в диапазоне доз ионизирующих излучений и УФ, вызывающих SOS-ответ [3, 55, 58].

Репарация ДНК и генетическая нестабильность у растений. Образование значительных повреждений ДНК при остром и хроническом облучении растений активирует систему индуцибельной SOS-репарации, предотвращающей гибель клеток, но приводящей к ошибкам репликации и повышению уровня мутагенеза [19]. Эта система репарации наиболее подробно исследована у микроорганизмов, но функционирует также и у высших растений, в частности гомолог гена *recA* *E. coli* в количестве более чем одной копии обнаружен в ядре арабидопсиса [62]. Активация SOS-системы является глобальным ответом клетки на повреждение ДНК, прототипом контроля клеточного цикла в сверхточных точках и системы репарации ДНК [7]. SOS-система, как известно, призвана не только репарировать, но и служит одним из механизмов (наряду с транслокациями МГЭ) быстрой перестройки генома. Мутации, возникающие в процессе SOS-репарации, обусловлены модификацией матрицы и свойств полимераз, изменениями последовательности нуклеотидов при заполнении пробелов [3].

Характер зависимостей “доза — эффект” для излучений с высокой и низкой линейной передачей энергии (ЛПЭ) указывает на то, что ДНК является первичной мишенью для индук-

ции геномной нестабильности с возникновением сложных первичных повреждений [12]. Факторы, которые индуцируют сложные повреждения ДНК, более эффективны в индукции генетической нестабильности [12]. К сложным повреждениям, имеющим критическое значение для геномов, относятся двойные разрывы ДНК, и их успешная репарация имеет определяющее значение для выживания организмов. Двойные разрывы ДНК у растений образуются при спонтанных окислительных повреждениях генома, облучении, образовании дицентрических хромосом, воздействии нуклеаз, эксцизии МГЭ, локализуясь преимущественно в регионах, прилегающих к гомологичным повторам [48].

Двойные разрывы могут репарироваться через законную (гомологичную) и незаконную рекомбинацию (с негомологичным соединением концов). В соматических клетках растений гомологичная рекомбинация в несколько раз менее эффективна и реже используется для репарации двойных разрывов, чем негомологичное соединение концов [48, 59, 60]. У растений последний механизм является менее точным, чем у других эукариотов, что может обуславливать его роль как движущей силы эволюции генома растений [61]. Ошибочная репарация двойных разрывов приводит главным образом к изменениям в результате делеций, инсерций и разных типов геномных перестроек [59]. В большинстве случаев негомологичные соединения происходят с изменением последовательности ДНК и образованием делеций на обоих концах, сопровождаясь у некоторых видов растений синтезом ДНК

и с последующим эктопическим множественным включением фрагментов ДНК, формированием появления относительно больших (до 1,2 кб) инсерций [60]. Вставочная ДНК имеет происхождение из внутренних регионов плазмид (у трансгенных растений) или хромосомной ДНК. Такой распространенный ДНК-захват у растений ассоциирован с незаконной рекомбинацией [60].

Роль эпигенетических механизмов в формировании геномной нестабильности растений. Генетическая нестабильность может опосредоваться эпигенетическими изменениями энзиматического контроля стабильности генома [14]. Изменение экспрессии может касаться не только генов, связанных с системами репарации ДНК, но и генов, продукты которых участвуют в трансдукции сигналов. Значительное влияние на состояние генома и генную активность оказывает система окислительно-восстановительного гомеостаза, связанная с продукцией активных форм кислорода, и система клеточных мембран.

Активные формы кислорода (АФК). В индукции и поддержании радиационно-индуцированной нестабильности генома важную роль играет состояние системы окислительно-восстановительного гомеостаза, которая в норме обеспечивает поддержание динамического равновесия между продукцией оксидантов и редуцирующих веществ. При стрессовых воздействиях, в частности при облучении, в ней отмечаются значительные изменения с развитием окислительного стресса и поддержанием экспрессии повышенной продукции АФК (O_2^- , OH^\cdot , H_2O_2), что

сопровождается нарушением образования эндогенных регуляторов синтеза антиоксидантов. Это будет приводить к возникновению повреждений ДНК [6, 7, 63–65]. Эффекты индуцированной генетической нестабильности связывают со сдвигами в системе окислительно-восстановительного гомеостаза в сторону повышенной продукции АФК и передачей этого состояния потомству облученных клеток посредством эпигенетических механизмов [7, 65].

У растений, как и у других организмов, АФК образуются в процессах нормального клеточного метаболизма, и повышение их концентрации происходит при стрессовых состояниях. Облучение вызывает повышение концентрации АФК как через неметаболическое образование (вдоль треков ионизации), так и через активацию их метаболической продукции. АФК образуются в результате активации двух важнейших сигнальных систем растительной клетки — липоксигеназной и НАДФ-оксидазной, локализованной в клеточной стенке, а также оксалаксидазы и пероксидазы, активизирующихся при щелочном сдвиге pH за пределами клетки (в частности, при заражении патогенами). Липоксигеназа растений относится к ферментам, отчетливо реагирующим на облучение [57]. Интенсификация функционирования липоксигеназной системы осуществляется не только за счет активации имеющихся в клетках ферментов, но и за счет повышения их содержания, вызванного активацией экспрессии генов, кодирующих липоксигеназы [66].

Образующиеся в результате воздействия ионизирующей радиации

АФК могут оказывать как повреждающее (усиление радиационного повреждения ДНК с увеличением частоты двойных разрывов ДНК, повреждение клеточных мембран), так и сигнальное действие. Увеличение концентрации АФК ведет к формированию сигналов о повреждении, имеющих геномное происхождение, и повышению уровня экспрессии генов репарации ДНК [29]. АФК могут также взаимодействовать с компонентами других сигнальных путей и вызывать в них повреждения, что приводит к искажениям в передаче клеточных сигналов. В результате всех этих эффектов АФК может происходить изменение генной экспрессии.

Вещества-антиоксиданты (токоферолы, каротиноиды и др.) проявляют значительные защитные свойства, что проявляется в повышении выживаемости клеток и снижении цитогенетических эффектов облучения. Известно, что выращивание потомства облученных клеток в присутствии низкомолекулярных антиоксидантов изменяет выраженность радиационно-индуцированной генетической нестабильности, приводя к понижению количества апоптотических клеток, восстановлению клоногенной активности, т.е. в этих условиях происходит компенсация нарушений образования эндогенных регуляторов синтеза антиоксидантов [7]. Высказано несколько предположений о возможных механизмах антимутагенного действия антиоксидантов, в частности ретинола [77]. Согласно одной из концепций, ретинол, как и его предшественник β -каротин, участвует в нормализации процессов окислительно-восстановительного метабо-

лизма, предотвращая развитие цепи свободнорадикальных и перекисных процессов. Согласно другой версии, ретинол может выступать как акцептор электронов, конкурируя с цитохромом Р-450 за электроны, что приводит к ингибированию определенных форм цитохрома Р-450 и других микросомальных ферментов, участвующих в метаболической активации промутагенов.

Таким образом, участие АФК в формировании генетической нестабильности растений может обуславливаться их повреждающим воздействием на геном растительных клеток (генотоксичностью), воздействием на клеточные мембраны и изменение проницаемости мембран (мембранный механизм действия АФК) и через их функцию — внутриклеточных посредников трансдукции сигналов.

Сигнальная роль конформационных изменений ДНК. Модификации спектра активных генов могут обуславливаться непосредственным воздействием на высшие уровни организации ДНК, и для экспрессии некоторых генов необходимо изменение конформации хроматина. Предполагается, что различные экзогенные и эндогенные воздействия могут восприниматься непосредственно на уровне торзионного давления (конформации) клеточной ДНК [67]. Изменение конформации ДНК возможно за счет посттрансляционной модификации ДНК-связывающих белков, нарушения проницаемости клеточных мембран и изменения концентрации низкомолекулярных ионов, действия АФК, образования одно- и двухцепочечных разрывов ДНК [63, 68–70]. Предполагают, что возможно существование потен-

циально активных последовательностей генов при определенном состоянии хроматина, переход в которое определяется параметрами среды в их определенном интервале (специфичном к данным условиям) [63]. К числу таких потенциально активных последовательностей могут принадлежать и гены, кодирующие ферменты репарации, поскольку, как известно, репарация ДНК в ряде случаев требует дополнительной экспрессии генов. С индуцированными изменениями в конформационной структуре хроматина связывают один из механизмов переключения клеток в новый режим функционирования (SOS-ответ) [55], что сопровождается стимуляцией генетических перестроек.

Связь характера стресс-индуцированных перестроек геномов растений с особенностями их эволюционного формирования. Результаты исследований воздействия различных стрессоров на геномы растений разных видов свидетельствуют, что геном в стрессовых условиях перестраивается неслучайным образом. При введении клеток в культуру изменялись те его участки, которые претерпели изменения в процессе видообразования. Отмечено существование определенных общих закономерностей перестроек растительного генома *in vitro* и при эволюции растений в природе [39]. Известно, что генетическая нестабильность, индуцированная действием ионизирующего излучения и УФ, характеризуется локусной специфичностью и существуют так называемые "горячие" точки мутагенеза [4, 14]. Н.П. Дубининым (1966) было высказано предположение, что в основе

радиационно-индуцированных генетических перестроек и адаптации к радиационным воздействиям лежат генетические процессы, выработанные в процессе эволюции видов [71]. При формулировании концепции действия малых доз ионизирующей радиации С.А. Гераськиным было отмечено, что неспецифический характер выявленных закономерностей цитогенетических нарушений и широкий спектр объектов, у которых они наблюдаются, свидетельствует о существовании общебиологического феномена, отображающего эволюционно закрепленный комплекс адаптивных реакций клеток к экстремальным воздействиям [72].

Считается, что достаточно адекватной моделью для изучения процессов адаптации растительных клеток в условиях стресса является культура каллусных клеток. При введении клеток в культуру у них формируется состояние стресса, что происходит из-за резкого изменения условий среды и нарушения межклеточных взаимодействий, обусловленных механическими контактами клеточных поверхностей и соответствующими градиентами концентраций веществ с регуляторными функциями (фитогормонов и др.). Процессы, сходные с происходящими при формировании популяций растительных клеток в культуре, наблюдаются у клеток животных в культуре в процессе ее становления, при опухолевом росте и, видимо, в процессе нормального онтогенеза [2]. Такие изменения "позиционной информации" возможны и при облучении растительных тканей, т.е. возможны определенные сходные черты при культуральном и радиационном стрессе.

Обнаружено, что у растительных клеток в условиях культуры *in vitro* рестраиваются, как правило, те последовательности генома, которые характеризуются межвидовым полиморфизмом, а вероятность перестроек относительно стабильных повторяющихся последовательностей, не имеющих межвидового полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, намного ниже [39]. Сходство генетических изменений, наблюдающихся у культивируемых клеток определенных видов растений *in vitro* и имевших место, как полагают, при формировании этих видов в природе, могут свидетельствовать об определенной общности механизмов эволюции растений и механизмов адаптации клеток к условиям изолированного роста.

Показано, что эволюция растительных форм идет в значительной мере путем смены уровней пloidности на основе процессов полиплоидизации и деплоидизации в пределах биологически оптимального уровня пloidности. Согласно последним оценкам, изменения пloidности могут составлять до 2-4% событий видообразования у цветковых растений и около 7% у папоротников [73]. Видообразование через полиплоидизацию является одним из доминирующих способов симпатрического видообразования благодаря потенцилу широкомасштабности эффектов в генетической регуляции и процессах развития, эффектам, которые могут обуславливать быстрые изменения в морфологии, системах размножения, экологической толерантности [73]. Например, у растений семейства *Solanaceae* многие виды родов *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* воз-

ники в результате полиплоидизации. И в культуре клеток этих видов геномная изменчивость — это в основном изменчивость числа хромосом, имеющая широкий размах и достигающая высоких уровней ploидности.

Спонтанная полиплоидизация и гибридизация — широко распространенные явления у растений, которые способствуют повышению их устойчивости и жизнеспособности в различных условиях среды [1, 74]. Около 70% растений являются полиплоидами, при этом преобладает аллополиплоидия [1]. Полиплоидизация может обеспечивать наличие значительного потенциала генетического разнообразия [73]. Гибридизация и полиплоидизация сопровождаются повышением уровня нестабильности генома, увеличением частоты мутаций, в основе которых часто лежат транспозиции МГЭ [1]. На ранних стадиях формирования полиплоидов имеют место изменения последовательностей ДНК, затрагивающие прежде всего микросателлитные последовательности [79]. Особенностью полиплоидных форм растений является также значительное расширение у них спектра рекомбинаций генетического материала. У отдаленных гибридов отмечаются различные хромосомные аномалии, нарушения митозов и нестабильность числа хромосом в соматических клетках, а в их потомстве наблюдается бурное формирование в различных направлениях [1]. Полагают, что быстрые и направленные изменения последовательностей ДНК, содержащих микросателлиты, у недавно сформировавшихся аллополиплоидов могут внести вклад в быструю эволюцию их ге-

номов и обуславливать последующую геномную дивергенцию [79]. У тритикале (*Triticosecale Wittmack*) значительным изменениям подвергаются и низкокопийные, и повторяющиеся последовательности ДНК с преобладанием элиминаций последовательностей, при этом повторяющиеся последовательности претерпевают значительно большие изменения [81].

У видов рода *Crepis*, которые отличаются морфологией хромосом, в частности у *C. capillaris*, геномная изменчивость — это, прежде всего, изменения морфологии хромосом с последующими перестройками кариотипа. При исследовании проростков, полученных из семян растений *Crepis tectorum* L. ($2n = 8$), произрастающих в зоне ЧАЭС на протяжении 3 лет (1987–1989 гг.), было зафиксировано 52 случая изменения кариотипа (преобладание перичентрических инверсий и реципрокных транслокаций, появление кариотипов с добавочной измененной хромосомой, с добавочными ацентрическими участками хромосом и отсутствием участков хромосом) [22, 75]. Особый интерес представляли случаи изменения кариотипа, когда имелось 9 хромосом с изменениями некоторых из них. При этом наблюдалась корреляция между частотой неидентичных кариотипических изменений и частотой появления клеток с абберациями в первом митозе клеток корешков, имевших нормальный кариотип, но эти показатели не зависели от мощности дозы γ -излучения [75]. Проростки с изменениями кариотипа наблюдали при довольно высоких уровнях радиоактивного загрязнения (мощность дозы составляла порядка 7,75 Кл/кг · ч).

В связи с этим было сделано предположение о возможности формирования состояния генетической нестабильности при действии хронического облучения, приводящего к индукции повышенного числа aberrаций хромосом в последующих поколениях растений.

Значительное увеличение количества генетического материала на геном (расширение кариотипа, увеличение числа отдельных хромосом) наблюдается у видов *Crepis*, распространенных в районах крайнего Севера (*C. sibirica*, *C. biennis*, *C. patana*) и высокогорьях (*C. dioscoridis*, *C. multicaulis*), что связывают с адаптацией видов к экстремальным условиям существования [76]. Показано существование индуцированной изменчивости хромосом у разных по филогенетическому возрасту видов *Crepis* при выращивании в условиях радионуклидного загрязнения [76].

У культивируемых штаммов *Rauwolfia serpentina* имеет место изменение копийности отдельных фракций повторяемых последовательностей, в частности увеличение количества повторов, которые быстро реассоциируют, появление качественно новых, отличающихся от имеющихся в геноме интактных растений, повторяющихся последовательностей [39]. Одним из механизмов, определяющих отличия в размерах геномов, может быть видоспецифическое увеличение/уменьшение количества повторяющихся последовательностей [59]. Объем геномов может увеличиваться за счет инсерций и дупликаций, а уменьшаться за счет делеций последовательностей. Считается, что повреждения ДНК, индуцирующие точечные и блочные перестрой-

ки генома, возникают не в области действия мутагенов, а в особых активных сайтах ДНК, в локусах, содержащих мини-сателлитные последовательности [7, 58].

Как полагают, межвидовая дифференциация геномов растений по количественному содержанию ДНК происходит главным образом через процессы наследственной полиплоидизации и вариации степени амплифицированности транспозонов (прежде всего, ретротранспозонов) [85]. Инсерции ретроэлементов создают значительный ресурс для расширения геномов растений и имеют видоспецифический характер [59]. Сходные механизмы изменения величины генома отмечаются для насекомых [59]. Эволюция геномов у диплоидной, тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы, произошедших от общего предка более 3 миллионов лет назад, сопровождалась инсерцией ретроэлементов, делециями транспозонов и неравной рекомбинацией между МГЭ [78, 79]. Полагают, что у подвидов риса *Oryza sativa subsp. indica* и *subsp. japonica* объем геномов существенно увеличился (на >2% для индийского и >6% — для японского подвида) с момента их дивергенции от общего предка главным образом благодаря амплификации ретротранспозонов LTR-типа [47].

Особенности репарации двойных разрывов в соматических клетках растений определяются размерами геномов и их организацией. Показано, что видоспецифические отличия по репарации двойных разрывов могут иметь значение для определения размеров генома и оказывать влияние на эволюцию геномов [59]. У арабидоп-

сиса, характеризующегося небольшими размерами генома, в отличие от геномов других растений, в частности бобовых, где имел место ряд сегментных дупликаций или дупликаций всего генома в ходе эволюции, образование делеций может играть ведущую роль, обуславливая малые размеры существующего в настоящее время генома у этих растений. Существует обратная корреляция между размерами генома и средней величиной делеций [59]. Делеции могут образовываться при участии разных механизмов — “проскальзывание” ДНК-полимеразы при репликации ДНК, неравного кроссинговера, при репарации двойных разрывов. У табака, имеющего приблизительно в 20 раз больший геном, чем арабидопсис, репарация почти каждого второго двойного разрыва сопровождается образованием инсерций в месте разрыва [59]. Инсерции последовательностей сопровождают образование делеций в крупном геноме кукурузы. Такие инсерции не были обнаружены у арабидопсиса, у которого, напротив, часто проявлялись крупные делеции [59]. Частота инсерций, как и их происхождение, значительно отличается у высших и низших эукариотов. В отличие от растений, у дрожжей при репарации двойных разрывов инсерции образуются редко и встраиваются преимущественно экстрахромосомная ДНК (сДНК ретротранспозонов, митохондриальная ДНК). У растений, например, у табака инсерционные последовательности были ядерного происхождения [59]. Механизм образования инсерций последовательностей, зависящий от синтеза ДНК, подобен механизму, играющему ведущую

роль в гомологичной репарации двойных разрывов в соматических клетках.

Предполагают, что перестройки генома, обнаруживаемые в культуре клеток и у растений-регенерантов, подчиняются закону гомологических рядов в наследственной изменчивости Н.И. Вавилова [39]. Не исключено, что те же закономерности обуславливают генетические изменения растений и при радиационном стрессе, обуславливая характер их генетической радиоадаптации.

В заключение следует отметить, что многочисленные факты, приводимые в литературе, подтверждают существование у растений различных форм генетической нестабильности, которая может иметь адаптивный характер. Генетическая нестабильность растений обычно проявляется в увеличении нормы фенотипического проявления тех или иных признаков, возрастании в поколениях частоты мутаций, хромосомных перестроек и хромосомного полиморфизма, изменении общей коадаптации генома (внутри- и межallelельных взаимодействий) и т.п. Уровень генетической нестабильности зависит не только от влияния внешних факторов, но и от генотипической среды данного организма. К наиболее вероятным механизмам, лежащим в основе спонтанной и индуцированной генетической нестабильности растений, следует отнести различные формы рекомбинации ДНК, амплификацию генов и дестабилизацию повторяющихся последовательностей ДНК, стимуляцию перемещений мобильных генетических элементов, индукцию процессов ошибочной репарации ДНК и др. Значительная роль в передаче состояния генетической нестабильности потомству принад-

лежит эпигенетическим механизмам регуляции генной активности — процессам метилирования ДНК, образования активных форм кислорода, модификаций белково-нуклеинового комплекса и конформации хроматина, изменениям состояния мембран, а также, возможно, другим, еще малоисследованным механизмам.

Список литературы

1. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка. — 1995. — 11, № 6. — С. 5–40.
2. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 6. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка. — 2000. — 16, № 3. — С. 159–185.
3. Соловьян В.Т. Приспособление клеток к неблагоприятным факторам. Индукция геномных перестроек // Биополимеры и клетка. — 1991. — 7, № 1. — С. 50–54.
4. Гребнева Е.А. Молекулярные механизмы образования мутаций замены оснований при пострепликативной SOS-репарации двухцепочечной ДНК, содержащей тиминовые димеры // Биополимеры и клетка. — 2001. — 17, № 6. — С. 487–500.
5. Браун В. Генетика бактерий. — М.: Мир, 1968. — 448 с.
6. Morgan W.F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro* // Radiat. Res. — 2003. — 159, N 5. — P. 567 — 580.
7. Мазурик В.К., Михайлов В.Ф. Радиационно-индуцируемая нестабильность генома: феномен, молекулярные механизмы, патогенетическое значение // Радиация. биология. Радиозэкология. — 2001. — 41, № 3. — С. 272–289.
8. Сусков И.И., Кузьмина Н.С. Проблема индуцированной геномной нестабильности в детском организме в условиях длительного воздействия малых доз радиации // Радиация. биология. Радиозэкология. — 2001. — 41, № 5. — С. 606–614.
9. Левитин М.М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов. — Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1986. — 208 с.
10. Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов. — М.: ИД "Муравей", 1998. — 384 с.
11. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. — М.: Наука, 1985. — 472 с.
12. Harms-Ringdahl M. Some aspects of radiation induced transmissible genomic instability // Mutat. Res. — 1998. — 404. — P. 27–33.
13. Lorimore S.A., Wright E.G. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? // Int. J. Radiat. Biol. — 2003. — 79, N 1. — P. 15–25
14. Гродзинський Д.М. Радіобіологія. — К: Либідь, 2000. — 448 с.
15. Глазко В.І., Глазко Т.Т. Популяційно-генетичні наслідки екологічних катастроф (на прикладі аварії на ЧАЕС) // Вісник аграрної науки. — 2004. — № 7. — С. 70–76.
16. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Двавахиya В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. — М.: Изд-во общества фитопатологов, 2001. — 302 с.
17. Горбачева Л.А., Дударева Н.А., Салганик Р.И. Молекулярные механизмы устойчивости к патогенам // Успехи современной биологии. — 1991. — 111, № 1. — С. 122–136.
18. Серова З.Я., Подчуфарова Г.М., Гесь Д.К. Окислительно-восстановительные процессы инфицированного растения. — Минск: Наука, 1982. — 232 с.
19. Шевченко В.А., Кальченко В.А., Абрамов В.И., Рубанович А.В., Шевченко В.В., Гриних Л.И. Генетические эффекты в популяциях растений, произрастающих в зонах Кыштымской и Чернобыльской аварий // Радиация. биология.

- Радиоэкология. — 1999. — 39, № 1. — С. 162–176.
20. Кальченко В.А., Рубанович А.В., Костина Л.Н., Шевченко В.А. Генетические эффекты в хронически облучаемых популяциях *Centaurea scabiosa* L., произрастающих на Восточно-Уральском радиоактивном следе // Генетика. — 1999. — 35, № 9. — С. 1236–1243.
 21. Ковбасенко В.М., Масло А.В. Особенности мутагенеза томата на фоне радиоактивного загрязнения // Радиобиологический съезд, Киев, 20–25 сентября 1993 г. — Ч. II. — Пушино: Пушинский научный центр, 1993. — С. 452–453.
 22. Шевченко В.В., Гриних Л.И., Шевченко В.А. Цитогенетические эффекты в природных популяциях *Crepis tectorum*, подвергающихся хроническому облучению в районе Чернобыльской АЭС // Радиобиология. — 1995. — 35, № 5. — С. 695–701.
 23. Цыцугина В.Г. Роль факторов надежности в адаптации природных популяций гидробионтов к антропогенному воздействию // Эвристичность радиобиологии. — Киев: Наук. думка, 1988. — С. 115–120.
 24. O'Sullivan D., Tosi P., Creusot F., Cooke B. M. et al. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* // Curr. Genet. — 1998. — 33, № 4. — P. 291–298.
 25. Пулькина С.В., Цитленок С.И. Встречаемость В-хромосом у *Centaurea scabiosa* L. в зависимости от местообитания и температуры // Экологическая генетика растений и животных. — Кишинев: Штиинца, 1984. — С. 88.
 26. Цитленок С.И. Адаптивная роль В-хромосом // Экологическая генетика растений и животных. — Кишинев: Штиинца, 1984. — С. 93–94.
 27. Шевченко В.А., Померанцева М.Д. Генетические последствия действия ионизирующих излучений. — М.: Наука, 1985. — 279 с.
 28. Ries G., Heller W., Puchta H. et al. Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants // Nature. — 2000. — 6, № 406 (6791). — P. 98–101.
 29. Filkowski J., Yeoman A., Kovalchuk O., Kovalchuk I. Systemic plant signal triggers genome instability // Plant J. — 2004. — 38, № 1. — P. 1–11.
 30. Момыналиев К.Т., Говорун В.М. Механизмы генетической нестабильности молликут (микоплазм) // Генетика. — 2001. — 37, № 9. — С. 1173–1187.
 31. van Belkum A., Scherer S., van Alphen L., Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in procaryotic genomes // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — 62, № 2. — P. 275–293.
 32. Сиволап Ю.М. Геном рослин // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліття. — Т. 1. — Київ: Логос, 2001. — С. 307–332.
 33. Салганик Р.И., Мазин А.В., Дианов Г.Л., Овчинникова Л.П. Индукция повторяющихся нуклеотидных последовательностей. Вероятные механизмы эволюции генома и геной конверсии // Генетика. — 1984. — XX, № 8. — С. 1244–1254.
 34. Sakowicz T., Bowater R., Parniewski P. Isolation, cloning and characterisation of motifs containing (GA/TC)_n repeats isolated from vetch, *Vicia bithynica* // Cell Mol. Biol. Lett. — 2004. — 9, N 3. — P. 557–566.
 35. Безлепкин В.Г., Газиев А.И. Индуцированная нестабильность генома половых клеток животных по мини- и микросателлитным последовательностям // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2001. — 41, № 5. — С. 475–488.
 36. Шнырева А.В. Транспозоны как факторы различных перестроек и модификаций в геномах грибов // Генетика. — 2003. — 39, № 5. — С. 621–636.
 37. Ратнер В.А., Васильева Л.А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Сорос. образоват. журн. — 2000. — 6, № 6. — С. 14–20.
 38. Зайнуллин В.Г. Генетические эффекты хронического облучения низкой интенсивности // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1997. — 37, № 4. — С. 555–559.
 39. Андреев І.О., Спірідонова К.В., Кунах В.А. Перебудови рослинного геному в куль-

- тури клітин *in vitro* // Біополімери і клітина.— 2004.— 20, № 1-2.— С. 42-49.
40. Wessler S.R. Transposable elements and the evolution of gene expression // Symp. Soc. Exp. Biol.— 1998.— 51.— P. 115-122.
 41. Kumar A., Bennetzen J.L. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet.— 1999.— 33.— P. 479-532.
 42. Зильберглейт А.С. IS-элементы и составные транспозоны бактерий: молекулярный механизм транспозиции // Успехи современ. биологии.— 1995.— 15, № 3.— С. 326-332.
 43. Ильина Т.С. Транспозоны бактерий и способы их перемещений // Генетика.— 1986.— XXII, № 11.— С. 2572-2581.
 44. Garber K., Bilic I., Pusch O., Tohme J., Bachmair A., Schweizer D., Jantsch V. The *Trp2* family of retrotransposons of *Phaseolus vulgaris*: structure, integration characteristics, and use for genotype classification // Plant Mol. Biol.— 1999.— 39.— P. 797-807.
 45. Kitamura K., Hashida S., Mikami T., Kishima Y. Position effect of excision frequency of *Anthirrhinum* transposon *Tam3*: implications for the degree of position-dependent methylation in the ends of the element // Plant Mol. Biol.— 2001.— 47.— P. 475-490.
 46. Miura A., Kato M., Watanabe K., Kawabe A., Kotani H., Kakutani T. Genomic localization of endogenous mobile CACTA family transposons in natural variants of *Arabidopsis thaliana* // Mol. Gen. Genomics.— 2004.— 270.— P. 524-532.
 47. Ma J., Bennetzen J.L. Rapid recent growth and divergence of rice nuclear genomes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2004.— 101, N 34.— P. 12404-12410.
 48. Siebert R., Puchta H. Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome // Plant Cell.— 2002.— 14, N 5.— P. 1121-1131.
 49. Kumar A., Pearce S.R., McLean K., Harrison G., Heslop-Harrison J.S., Waugh R., Flavell A.J. The *Ty1*-copia group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers // Genetica.— 1997.— 100, № 1-3.— P. 205-217.
 50. Iida S., Morita Y., Choi J.D., Park K.I., Hoshino A. Genetics and epigenetics in flower pigmentation associated with transposable elements in morning glories // Adv. Biophys.— 2004.— 38 (Compl.).— P. 141-159.
 51. Eisses J.F., Lafoe d., Scott L.-A., Weil C.F. Novel, developmentally specific control of *Ds* transposition in maize // Mol. Gen. Genet.— 1997.— 256.— P. 158-168.
 52. Fridlender M., Sitrit Y., Shaul O., Gileadi O., Levy A.A. Analysis of the *Ac* promoter: structure and regulation // Mol. Gen. Genet.— 1998.— 258.— P. 306-314.
 53. Зайнуллин В.Г., Шапошников М.В., Юрашева И.Н. Генетические эффекты у *Drosophila melanogaster*, индуцированные хроническим облучением в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология.— 2000.— 40, № 5.— С. 567-575.
 54. Михеев А.Н., Гуца Н.И., Малиновский Ю.Ю. Эпигенетические реакции клеток на действие ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология.— 1999.— 39, № 5.— С. 548-556.
 55. Гераськин С.А. Концепция биологического действия малых доз ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология.— 1995.— 35, № 5.— С. 571-580.
 56. Салганик Р.И. Молекулярные механизмы стресс-индуцированной наследственной изменчивости // Генетика.— 1987.— XXIII, № 6.— С. 1003-1010.
 57. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. — Киев: Наук. думка, 1989.— 384 с.
 58. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. Саморегуляция паразитарных систем. Молекулярно-генетические механизмы.— Ленинград: Медицина, 1987.— 240 с.
 59. Kirik A., Salomon S., Puchta H. Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants // EMBO J.— 2000.— 19, N 20.— P. 5562-5566.

60. Gorbunova V.V., Levy A.A. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair // *Trends Plant Sci.*— 1999.— 4, № 7.— P. 263–269.
61. Tuteja N., Singh M.B., Misra M.K., Bhalla P.L., Tuteja R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*— 2001.— 36, N 4.— P. 337–397.
62. Britt A. DNA damage and repair in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*— 1996.— 47.— P. 75–100.
63. Спитковский Д.М. Концепция действия малых доз ионизирующих излучений на клетки и ее возможные приложения к трактовке медико-биологических последствий // *Радиобиология.*— 1992.— 32, № 3.— С. 382–400.
64. Михайлов В.Ф., Мазурик В.К., Бурлакова Е.Б. Сигнальная функция активных форм кислорода в регуляторных сетях ответа клеток на повреждающие воздействия: участие в реализации радиочувствительности и нестабильности генома // *Радиац. биология. Радиоэкология.*— 2003.— 43, № 1.— С. 5–18.
65. Бурлакова Е.Б., Михайлова В.Ф., Мазурик В.К. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцированной нестабильности генома // *Радиац. биология. Радиоэкология.*— 2001.— 41, № 5.— С. 489–499.
66. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений.— М.: Наука, 2002.— 294 с.
67. McClellan J.A., Voublikova P., Palecek E., Lilley D.M.J. Superhelical torsion in cellular DNA responds directly to environmental and genetic factors // *Proc. Nat. Acad. Sci.*— 1990.— 87.— P. 8373–8377.
68. Эйдус Л.Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз. Новый взгляд на проблему.— М., 2001.— 82 с.
69. Жихина Г.П., Палиевская Т.М. Действие пероксида водорода в малых концентрациях на структуру ДНК // *Радиац. биология. Радиоэкология.*— 2003.— 43, № 2.— С. 147–149.
70. Коломієць О.Д. Неспецифічні реакції рослинних клітин на стресові фактори // *Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть.*— Т. 2.— Київ, 2001.— С. 41–47.
71. Дубинин Н.П. Эволюция популяций и радиация.— М.: Атомиздат, 1966.— 744 с.
72. Geras'kin S.A. The problem of estimation of cytogenetic effects of low-level and combined action at plant // *Int. Conf. 'Modern problems of radiobiology, radioecology and evolution'* (Sept 6-9, 2000).— Dubna, 2000.— P. 112.
73. Otto S.P., Whitton J. Polyploid incidence and evolution // *Annu. Rev. Genet.*— 2000.— 34.— P. 401–437.
74. Гродзинський Д.М., Коломієць О.Д., Бурденюк Л.А., Фалінська Т.П. Довготривала спадкова геномна нестабільність, індукована аварійними викидами ЧАЕС // III З'їзд з радіаційних досліджень (радіобіологія і радіоекологія). Київ, 21-25 травня 2003 р.— Київ: Фітосоціоцентр, 2003.— С. 28.
75. Шевченко В.В., Гриних Л.И., Абрамов В.И. Цитогенетические эффекты в природных популяциях *Crepis tectorum* L., произрастающих в районе Восточно-Уральского радиоактивного следа // *Радиац. биология. Радиоэкология.*— 1998.— 38, № 3.— С. 330–335.
76. Гостева О.В. Каріотипова різноманітність деяких видів роду *Crepis* L.: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.15 / Ін-т клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.— Київ, 2000.— 16 с.
77. Мамедли С.А. Механизмы генозащитного действия ретинол-ацетата.— К.: Логос, 2004.— 148 с.
78. Isidore E., Scherrer B., Chalhoub B., Feuillet C., Keller B. Ancient haplotypes resulting from extensive molecular rearrangements in the wheat A genome have been maintained in species of three different ploidy levels // *Genome Res.*— 2005.— 15, № 4.— P. 526–536.
79. Zhang P., Li W., Friebe B., Gill B.S. Simultaneous painting of three genomes in hexaploid wheat by BAC-FISH // *Genome.*— 2004.— 47, N 5.— P. 979–987.

80. Stein N., Feuillet C., Wicker T., Schlagenhauf E., Keller B. Subgenome chromosome walking in wheat: a 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the Lr10 resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 2000.— 97, N 24.— P. 13436–13441.
81. Ma X.F., Fang P., Gustafson J.P. Polyploidization-induced genome variation in triticale // Genome.— 2004.— 47, N 5.— P. 839–848.
82. Puertas M.J. Nature and evolution of B chromosomes in plant: a non-coding but information-rich part of plant genome // Cytogenet. Genome Res.— 2002.— 96, N 1-4.— P. 198–205.
83. Мошкович А.М. Добавочные хромосомы покрытосеменных растений.— Кишинев: Штиинца, 1979.— 164 с.
84. Кравец Е.А., Гродзинский Д.М., Коломиец О.Д. Цитозембриологические аспекты отдаленных последствий хронического облучения у ржи // Фактори експериментальної еволюції організмів.— К.: Аграрна наука, 2004.— С. 132–136.
85. Bennetzen J.L., Ma J., Devos K.M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants // Ann. Bot. (Lond.).— 2005.— 95, N 1.— P. 127–132.

Представлено В. А. Кунахом
Надійшла 10.09.2006

СПОНТАННА ТА ІНДУКОВАНА ГЕНЕТИЧНА НЕСТАБІЛЬНІСТЬ У СОМАТИЧНИХ КЛІТИН РОСЛИН

Ю.В. Шилина¹, С. А. Мамедлі²,
Н.М. Рашидов¹

¹Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,

Україна, Київ 01143, вул. Академіка Заболотного, 148; e-mail: lowdose2004@yahoo.com
²Інститут радіаційних проблем НАН Азербайджану,
Азербайджан, Баку,
проспект Г. Джавіда, 31а

Розглянуто основні форми і механізми спонтанної та індукованої генетичної нестабільності у рослин. Відзначено, що індукована генетична нестабільність має видоспецифічні характеристики, що відображає особливості формування даного виду в процесі еволюції.

Ключові слова: рослини, генетична нестабільність, епігенетична мінливість, адаптація, іонізуюче випромінювання.

THE SPONTANEOUS AND INDUCED GENETIC INSTABILITY AT PLANT SOMATIC CELLS

Y.V. Shilina¹, S. A. Mamedli²,
N. M. Rashidov¹

¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, Ukraine, 01143, Kyiv, 148 Zabolotny st., e-mail: lowdose2004@yahoo.com

²Institute of radiation problems, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Azerbaijan, Baku, G. Javida st., 31a

The general forms and mechanisms of spontaneous and induced genetic instability at plants are considered. The existence of the species-specific characteristic of induced genetic instability, that reflects features of formation of the given species during evolution was marked.

Key words: plant, genetic instability, epigenetic modification, adaptation, ionizing radiation.

УДК 633.63:632.938.1

РИЗОМАНІЯ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ТА МЕТОДИ СТВОРЕННЯ СТІЙКИХ СЕЛЕКЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ

М.В. РОЇК, А.К. НУРМУХАММЕДОВ, Н.О. ВАСИЛЬЄВА

Інститут цукрових буряків УААН,
Україна, 03141, Київ, вул. Клінічна, 25,
E-mail: isb@isb.kiev.ua

В огляді, присвяченому проблемі ризоманії, показано досягнення українських вчених в дослідженні біології збудника цієї хвороби (ВНПЖБ), її переносника (*Polymyxa betae*), удосконалення методів оцінки та створення стійких селекційних матеріалів цукрових буряків. Показано особливості передачі ознаки стійкості до ризоманії від диких форм буряків за допомогою беккросних схрещувань, розподіл ознаки в потомствах, створено генетичну колекцію стійких форм. За допомогою молекулярно-генетичних маркерів відібрано лінії цукрових буряків, стійкість яких до ризоманії обумовлена геном (генами), відмінним від відомого гена стійкості *Rz*.

Ключові слова: цукрові буряки, ризоманія, стійкість, беккросні схрещування.

Вступ. Ризоманія — надзвичайно шкодочинна карантинна хвороба цукрових буряків, спричиняється вірусом некротичного пожовтіння жилок буряків (ВНПЖБ), її переносник — ґрунтовий плазмодіофоровий гриб *Polymyxa betae* [1]. Симптоми проявляються як на листках, так і на коренеплодах. На коренеплодах уражених рослин спостерігається надзвичайне розростання бічних корінців та утворення “мочки”, або “бороди”. При ранній інфекції рослини якщо не гинуть, то в кінці вегетаційного періоду сильно відстають у рості, мають дрібні недорозвинені коренеплоди, їх маса у 10–15 разів менша, ніж у нормально розвинених рослин. В уражених рослинах відзначається зменшення вмісту води в коренеплодах — це пов’язано з порушенням функціонування провідної системи через некроз судинних пучків, що виразно видно на розрізі коренеплоду. Відбувається зменшення вмісту сухих речовин, загального і а-амінного азоту, а кількість натрію, калію, кальцію зростає порівняно зі здоровими коренеплодами, що призводить до зниження виходу цукру із сировини [2].

Втрати врожаю варіюють залежно від географічних зон вирощування і особливостей метеорологічних умов року, але при цьому вони за-

© М.В. РОЇК, А.К. НУРМУХАММЕДОВ, Н.О. ВАСИЛЬЄВА, 2006

лишаються дуже істотними. Значне ураження рослин ризоманією призводить до втрат врожаю на 50% і більше, при цьому цукристість коренеплодів знижується з 16–18% до 10% [3]. За нашими даними, на уражених територіях продуктивність сприйнятливих гібридів цукрових буряків знижується більше ніж у два рази, а цукристість коренеплодів в середньому на 2%. Уражені ризоманією рослини схильні до загнивання — сильно уражені рослини загнивають ще в полі, а інші ста-

85 нм (рис. 1) [4, 7]. Секвінування генної послідовності різних ізолятів ВНПЖБ довело їх подібність. Наприклад, різниця між японським ізолятом ВНПЖБ-С та французьким ВНПЖБ-Ф2 складала лише: 1,7% (РНК 1), 4,1% (РНК 2), 2,9% (РНК 3) та 3,6% (РНК 4) [5].



Рис. 1. Вірус некротичного пожовтіння жилок буряків при інструментальному збільшенні 40000^x, [7]

Збудник і переносник хвороби.

Збудник ризоманії — ВНПЖБ — багатоконпонентний вірус з розділеним геномом у вигляді чотирьох або п'яти РНК, кожна з яких відіграє відповідну роль у процесі репродукції і трансляції вірусу (табл. 1).

Віріони ВНПЖБ за морфологією являють собою жорсткі палички діаметром 20 нм. Довжина їх — 390, 265, 100 і

Таблиця 1. Основні характеристики компонентів вірусу некротичного пожовтіння жилок буряків [5]

Компоненти вірусу, які містять	Довжина, нм	Загальна кількість нуклеотидів, п.н.	Основна функція
РНК 1	390	6746	Кодує вірусну РНК-полімеразу та репліказу
РНК 2	265	4609	Кодує 75 кБ білок, 21 кБ поверхневий білок та 3 білки (13 кБ, 15 кБ та 42 кБ), які відповідають за транспорт вірусу "від клітини до клітини"
РНК 3	100	1774	Кодує 25 кБ білок, який відповідає за прояв симптомів хвороби, частково — за розмноження вірусу та його розповсюдження в рослинах цукрових буряків
РНК 4	85	1465	Кодує 31 кБ білок, який відповідає за перенос вірусу грибом <i>P. betae</i>
РНК 5*	65	1320	Кодує 26 кД білок, який, можливо, впливає на прояв симптомів хвороби

Примітка: РНК 5 виявлено не у всіх ізолятах.

На основі вивчення молекулярно-генетичних показників визначено різні патотипи: А, В, а також патотип Р (ізоляти, які містять РНК 5). А та В патотипи ВНПЖБ відрізняються за 5% нуклеотидів їх РНК [6].

А — тип широко розповсюджений на півдні Європи (в Італії, Іспанії, колишній Югославії), частково у Польщі, Швеції, Нідерландах, а також у США, Китаї, Японії, Ірані. Секвінування геномної послідовності рівненського ізоляту ВНПЖБ, проведене нами спільно з німецькими вченими, показало його приналежність до А-патотипу [7].

В — тип розповсюджений, головним чином, у Франції і Німеччині, а також, подекуди, у Швеції, Польщі, Угорщині і Британії.

Р — тип виділено в Японії і Китаї. Ізоляти з додатковою геномною РНК виявлені також у Європі, біля м. Пітівієра (Франція) і біля м. Норвіча в Британії. Ізоляти ВНПЖБ з РНК 5 було знайдено також у Казахстані [8].

Відомо, що ізоляти, які містять РНК 5, є більш патогенними, ніж інші патотипи вірусу. За результатами оцінки 12 стійких до ризоманії сортів цукрових буряків, виведених різними європейськими селекційними фірмами, показано, що реакція одного і того ж сорту на різні патотипи ВНПЖБ значно відрізняється. Найменш патогенним виявився патотип В порівняно з патотипами А та Р [9].

Переносник ВНПЖБ — гриб *Polymyxa betae* уражує цукрові буряки і деякі овочеві культури. Коло сприйнятливих до *P. betae* рослин досить вузьке — це, головним чином, види родини *Chenopodiaceae*, а також окремі представники родин *Portulacaceae* і *Amaranthaceae* [10].

Гриб виявлено у ґрунті всіх країн, де зареєстрована ризоманія буряків. *P. betae* сам по собі є слабовірулентним для рослин буряків, але може дещо сповільнити ріст сходів. Вірулентність гриба стрімко зростає при набутті ним вірофорності — наявності в ньому вірусу, носієм якого він може стати, якщо розвивається в ураженій ВНПЖБ рослині. ВНПЖБ виявлено в цитоплазмі клітини гриба, всередині плазмодія, в зрілих зооспорангіях, на поверхні цистосорусів чи в просторі між ними, але не всередині цистосорусів [11].

Цисти *Polymyxa betae* — самостійні клітини, кулясті, 4,2–5,0 мкм у діаметрі, з безбарвною гладенькою оболонкою. Циста після проростання утворює одну первинну зооспору. В клітині зустрічається по 2–3 спорангіальних плазмодія і від 4 до 300 цистосорусів, які варіюють за формою. Зооспори пересуваються за допомогою двох джгутиків [12]. *P. betae* характеризується складним життєвим циклом, який складається з декількох морфологічних стадій розвитку [13]. Збереження ВНПЖБ у цистосорусах *P. betae* забезпечує надійний захист від несприятливих умов.

В екологічному аспекті для *P. betae* сприятливі ті самі умови, що є оптимальними і для розвитку цукрових буряків — нейтральні і слаболужні ґрунти (рН 7–8), температура ґрунту 20...28 °С, висока його вологість. Близьке залягання ґрунтових вод сприяє підвищенню активності переносника збудника ризоманії. Вид і структура ґрунту також впливає на його розвиток. Особлива небезпека накопичення вірусу та його переносника існує в полях, де постійно або тимчасово переважає застійна волога. Відзначено, що при сильному

прогріванні ґрунтів хвороба поширюється швидше.

Відомо, що ВНПЖБ зберігається в плазмодіях *P. betae* не менше 30 років, що робить такий метод захисту, як сівозміна, малоефективним проти ризоманії. На заражених ділянках єдиним ефективним методом захисту, що дозволяє безупинно вирощувати культуру і обмежити подальше поширення ризоманії, є вирощування стійких сортів і гібридів цукрових буряків. Тому основна увага в захисті від цих захворювань приділяється селекційно-генетичним методам.

Поширення ризоманії. Ризоманія вперше виявлена в Італії, в долині ріки По [14]. У 1964 році через сильне ураження ризоманією вирощування цукрових буряків стало нерентабельним на площі понад 10 тис. га, а до 1967 року ризоманія цілком охопила північну і східну частини Центральної Італії. Поширення ризоманії з Італії в інші країни Західної Європи відбувалося надзвичайно швидко. Вже в 1971 році були відзначені перші вогнища хвороби у Франції і Югославії, а у 1972 році — в Греції. З того часу хвороба поширилася на всі країни Західної і Східної Європи, багато країн Азії та Америки [15].

До впровадження у виробництво стійких сортів цукрових буряків ризоманія представляла серйозну загрозу також для Південної та Центральної Європи. У країнах Західної Європи обстежено 1,6 млн. га на наявність ризоманії; в 1990 р. було заражено 15% площ вирощування цукрових буряків, а в 2000 р. — 38%. За прогнозами, у 2010 р. буде інфіковано 56% площ вирощування. Площа посіву стійких до ризоманії сортів складає більше ніж 700 тис. га [16].

На території колишнього Радянського Союзу симптоми ризоманії були описані в Чуйській долині наприкінці 70-х років. Збудник ризоманії — ВНПЖБ і його переносник *P. betae* були виявлені в цьому районі в 1985 році [17]. Катастрофічними були наслідки ризоманії для Киргизстану. Цукрові буряки вирощували на площі понад 50 тис. га, середня їх врожайність складала 34,6 т/га, працювало 6 цукрових заводів. Перші симптоми ризоманії на цукрових буряках було виявлено в 1979 році, а вже в 1985–1987 роках кількість уражених рослин сягала 50–70%. Врожайність цукрових буряків знизилася до 20 т/га, вміст цукру в них складав лише 6–8%. На початку 90-х років всі 6 заводів були закриті та переобладнані для переробки плодово-овочевої продукції, виробництво цукрових буряків було припинено, і тільки на початку 2000 р. вдалося відновити виробництво культури.

В Україні ризоманія є карантинною хворобою і вперше була виявлена співробітниками Інституту цукрових буряків у 1997 році [18, 19, 20]. Передумовою появи і поширення ризоманії було надзвичайно активне ввезення посадкового матеріалу різних сільськогосподарських культур та насіння цукрових буряків із країн Західної Європи, де широко розповсюджена хвороба. Співробітниками підрозділу протягом 1997–2006 рр. проводилися обстеження посівів цукрових буряків, вірус — збудник ідентифіковано в 77 районах 17 областей і в 4-х районах АР Крим. Особливо небезпечна ситуація склалася в західних регіонах України — в деяких господарствах концентрація вірусу перевищує допустимий поріг у декілька десятків разів (рис. 2). Крім

того, процес активного накопичення інфекції також відбувається й у центральних областях (Хмельницькій, Вінницькій, Черкаській, Київській).

Стійкість цукрових буряків до ризоманії. Стратегія захисту від ризоманії ґрунтується на використанні на інфікованих територіях стійких гібридів цукрових буряків [21]. При створенні стійких матеріалів особливе значення має достовірна ідентифікація ВВПЖБ. Для цього використовується весь арсенал сучасних засобів — від аерофотозйомки на інфрачервону плівку до найчутливіших сучасних методів — імуноелектронної мікроскопії, імуноферментних методів аналізу і ДНК-технологій.

У зв'язку зі значною шкідливістю ризоманії і карантинним статусом хво-

роби оцінку стійкості цукрових буряків доцільно проводити в теплиці та на спеціальних інфекційних ділянках. Запропоновано кілька способів створення інфекційних фонів. Широко використовується метод внесення цистоспорусів і зооспор переносника хвороби *P. betae* у посудину з піском, де вирощується розсада цукрових буряків [22]. Paul зі співавторами [23] рекомендують вирощувати проростки цукрових буряків при температурі 23/17°C (день/ніч). Для створення інфекційного фону також можна використовувати ґрунт із заражених ВВПЖБ ділянок.

Найбільш розповсюдженим способом створення стійких селекційних матеріалів є схрещування різних за стійкістю форм цукрових буряків [24, 25]. Перший стійкий до ризоманії ма-



Рисунок 2. Ареал ВВПЖБ в зонах бурякосіяння України, 1997–2006 рр.

теріал було отримано методом внутрішньовидової гібридизації церкоспоростійкого номера, який походить із долини По в Італії [26]. Перші стійкі до ризоманії сорти Дора, Ліна і гібрид Rizer було також отримано за допомогою внутрішньовидових схрещувань і доборів [27]. У селекційних програмах широко використовується міжвидова гібридизація, особливо з *Beta vulgaris subsp. maritima* L. Ген стійкості до ризоманії *Rz₁*, який був виявлений у лінії "Холі" (Цукрова компанія Холі, США) і на основі якого створено більшість селекційних матеріалів цукрових буряків, стійких до ризоманії, також отримано від *B. vulgaris subsp. maritima* [28, 29]. Перспективними виявилися також міжвидові гібриди з представниками секції *Corollinae*: *Beta corolliflora* Zoss., *B. intermedia* Bunge і *B. lomotogona* Fish. et May [30]. Значний інтерес представляють також види *B. procumbens* і *B. patellaris*, які мають високу стійкість до *Polymyxa betae* [31].

Основним методом створення стійких до ризоманії селекційних матеріалів є передача ознаки стійкості від диких форм за допомогою беккросних схрещувань [32]. У зв'язку з цим нами проведено дослідження з беккросування кращих комбінаційно-здатних ліній Ялтушківської ДСС з донорами стійкості до ризоманії AC 48 (*B. vulgaris subsp. maritima* × *B. vulgaris* var. *saccharifera* C 37) і AC 50 (*B. vulgaris subsp. maritima* × *B. vulgaris* var. *saccharifera* Y 54), у яких присутній ген *Rz₁* від *B. vulgaris subsp. maritima*. Але у зв'язку з тим, що дані лінії проходили недостатній цикл доборів, в них збереглося багато ознак дикого виду і тому ген *Rz₁* з них можна використовувати лише за допомогою насичуючих схрещувань [20].

Оцінка селекційних матеріалів, отриманих від беккросних схрещувань диплоїдних ліній з донорами AC 48 та AC 50 на інфекційному фоні ризоманії, показала, що в потомстві першого беккросу кількість високостійких та стійких гібридних комбінацій, які будуть використані для подальшої роботи, складала 27 шт., а кількість сприйнятливих комбінацій — 39,4% від загальної кількості гібридних комбінацій (табл. 2). Після доборів та четвертого беккросу кількість стійких матеріалів зросла до 61 шт., а кількість сприйнятливих знизилася до 38.

Аналіз розподілу потомства за показником стійкості до ризоманії показує, що у BC_1 ознаку стійкості до ризоманії фенотипово проявили 46,5% гібридних комбінацій (сума гібридних комбінацій за типами стійкості — високостійкі, стійкі та слабостійкі), а BC_4 — 77%. Отримані показники розподілу BC_1 — BC_4 знаходяться близько статистично очікуваного розподілу потомства у беккросних схрещуваннях, які контролюються одним домінантним геном.

Проведено аналіз успадкування ознаки стійкості в потомствах від схрещування комбінаційно-здатних ліній з донорами стійкості. Після першого беккросного схрещування потомство першого беккросу було представлено 50% фенотипово стійких рослин. Слід зазначити, що потомство BC_1 уражувалося ризоманією сильніше, ніж потомство F_2 , але не вище, ніж донори стійкості. Можливо, це пояснюється розщепленням ознаки ($Aa \times aa > Aa + aa$), а також іншими зовнішніми факторами, які впливають на ступінь прояву ризоманії. Дібране потомство четвертого беккросного схрещування BC_4 було

Таблиця 2. Розподіл за стійкістю до ризоманії селекційних матеріалів BC₁ — BC₄, отриманих від схрещування комбінаційно-здатних ліній та донорів стійкості AC 48 та AC 50, шт. (АПФ Крупець, Рівненська область, 1998–2006 рр.)

Селекційні матеріали	Тип стійкості та абсорбція ВНПЖБ (A ₄₀₅)				
	високостійкі, < 0,020	стійкі, 0,021–0,050	слабостійкі, 0,051–0,100	середньо-сприйнятливі, 0,101–0,150	сприйнятливі, > 0,150
BC ₁	19	8	39	20	56
BC ₂	4	23	12	5	8
BC ₃	7	35	42	19	16
BC ₄	14	47	67	27	11

Примітка: абсорбція ВНПЖБ (A₄₀₅) — оптична щільність комплексу, який утворюється при взаємодії гомологічних антигена і антитіла і визначається спектрофотометрично при довжині хвилі 405 нм.

більш стійким порівняно з BC₁. Стійкість деяких ліній була більшою або на рівні донорів. Така тенденція, можливо, пояснюється тим, що донори стійкості AC 48 та AC 50 отримані від схрещування цукрових буряків з кількома популяціями *B. vulgaris subsp. maritima*. Зокрема, у створенні AC 48 брали участь 2 стійкі до ризоманії лінії *B. vulgaris subsp. maritima* з Данії, а для AC 50 використано більше 60 стійких до ВНПЖБ зразків *B. vulgaris subsp. maritima* з Європи та Середнього Сходу. Дані лінії-донори по суті є дуже гетерозиготними і складають популяцію різних за рівнем стійкості до ВНПЖБ генотипів. В результаті оцінки методом ІФА дібрано лінії з матеріалів з високим рівнем стійкості до ВНПЖБ.

Важливим завданням при створенні стійких до ризоманії селекційних матеріалів є забезпечення їх достатньо високої продуктивності як на інфекційному фоні хвороби, так і за відсутності ВНПЖБ. Результати досліджень показали, що врожайність ліній на інфекційному фоні ВНПЖБ складала 15% порівняно зі стандартом — стійким гібри-

дом Rizer, а за відсутності ВНПЖБ — 94,1% (стандартом був гібрид Ялтушківський ЧС 72). Показники врожайності донорів стійкості AC 48 та AC 50 також були низькими — 81,4% та 64,1% порівняно зі стандартом на інфекційному фоні та 93,4% і 88,3% — за відсутності ВНПЖБ, відповідно. Беккросні схрещування та цілеспрямовані добори на стійкість та продуктивність дозволили покращити показник врожайності матеріалів. Наприклад, якщо у потомства F₁ врожайність матеріалів на інфекційному фоні складала всього ~45% від Rizer, то після BC₄ врожайність підвищилася до 90–105%. За відсутності ВНПЖБ врожайність матеріалів в потомствах BC₄ була на рівні гібрида Ялтушківський ЧС 72.

Таким чином, в результаті оцінки стійкості до ВНПЖБ більше ніж 450 селекційних матеріалів встановлено ефективність селекційної програми, яка базується на беккросних схрещуваннях для передачі ознаки стійкості до збудника хвороби в перспективні селекційні лінії цукрових буряків.

Використання методів біотехнології для створення стійких до ризоманії селекційних матеріалів цукрових буряків. Останнім часом при створенні стійких до хвороб матеріалів великого значення набувають методи біотехнології та генної інженерії [33]. Зокрема, проводиться робота зі створення трансгенних рослин на основі білка оболонки вірусу, у ході якої в буряки вводиться ген, який кодує білок вірусної оболонки, внаслідок чого відбувається порушення циклу розмноження вірусу в рослині [34]. При передачі ознаки стійкості до ВВПЖБ, крім білка оболонки вірусу, можна використовувати фрагмент ДНК, який є гомологічним до відповідної геномної РНК-1 вірусу. Цей фрагмент ДНК разом із промотором вводиться в клітину, з якої шляхом регенерації отримують трансгенну форму цукрових буряків. Однак із введенням трансгенних рослин у виробництво виникає певний ризик рекомбінації геномів вірусів і трансгенних рослин, що може призвести до виникнення нових форм вірусів зі зміненим колом господарів та специфічністю вектора [35].

За допомогою молекулярних маркерів ідентифіковано гени стійкості до ризоманії. Вивчення успадкування ознаки стійкості до ВВПЖБ геном *Rz₁* ("Холі") показало, що ознака успадковується домінантно і контролюється моногенно [6]. Scholten зі співавторами [37] встановили ще один ген стійкості — *Rz₂*, виділений з матеріалу *Beta vulgaris subsp. maritima WB 42* датського походження. Цей ген виявився ефективнішим, ніж у матеріалі "Холі". Ознака стійкості у *WB 42* успадковується також домінантно. Кількість генів стійкості у матеріалі *B. vulgaris subsp. mari-*

tima WB 42 остаточно ще не встановлена [38, 39].

Пошук та впровадження нових генів стійкості до ризоманії є актуальним напрямком селекції цукрових буряків. У зв'язку з цим нами також були проведені дослідження з пошуку нових джерел стійкості серед селекційних матеріалів вітчизняної селекції.

Результати досліджень показали, що серед селекційних матеріалів, які пройшли попередній добір на інфекційному фоні ризоманії і зберігаються в колекції Інституту, є стійкі генотипи. У більшості досліджених ліній вміст вірусу був нижчим, ніж у стійкого гібрида *Rizor*, особливо у ліній *AR 19* та *AR 64 MC*, *AR 65 mm*, *AR 100* та *AR 115*.

Нами було висловлено припущення про те, що стійкість даних селекційних ліній не обумовлена відомими генами стійкості, зокрема геном *Rz₁*. На користь цієї ідеї вказувало те, що для добору на інфекційному фоні в Киргизстані (1986–1989 рр.) використовувались стійкі до церкоспорозу селекційні матеріали і їх не схрещували з жодними відомими на той час донорами стійкості до ризоманії. Для перевірки цієї гіпотези спільно з ученими з Інституту селекції рослин ім. Макса Планка (Німеччина) нами проведено дослідження ідентичності гена(ів), який(і) обумовлює(ють) стійкість цих ліній, з геном *Rz₁*, за допомогою STS маркерів [40].

Стійкі до ризоманії матеріали були проаналізовані за двома маркерами — *B40S* і *B2S* (табл. 3). Для найближчого маркера (*B40S*) у матеріалах, відібраних в умовах Киргизстану, жодного алеля для *Rz₁* гена не виявлено. Для маркерного гена *B2S*, який розташований на відстані 1,5 сМ від *Rz₁*, такі алелі

виявлені для ліній AR 51, AR 19, AR 101 і AR 100. Тільки в одній рослині лінії AR 19 було встановлено наявність маркерного алеля. Результати ПЛР-аналізу за допомогою STS-маркерів вказують на те, що селекційні лінії, які зберігаються в ІЦБ УААН, не містять *Rz* гена, а наявність алелів біля гена, можливо,

пов'язана або з генами — аналогами (*RGAs*), яких відомо на сьогодні близько 47, або ж позиційним ефектом гена *Rz*.

Таким чином, результати досліджень підтвердили попередню гіпотезу про те, що стійкість селекційних матеріалів, які зберігаються в колекції ІЦБ УААН, не пов'язана з геном стійкості

Таблиця 3. Результати STS та частота визначення локусів у деяких досліджуваних генотипах цукрових буряків

Лінія	Маркер			
	B40S 0,3 сМ проксимальний		B2S 1,2 сМ дистальний	
	локус	частота алеля, %	локус	частота алеля, %
AR 16	s+1	80	s2+x	30
	s	20	1	10
			s2+3	50
			s2	10
AR 19	s+1	30	1+r	40
	s	70	s2+x	40
			r	10
			2	10
AR 100	s	100	s2	30
			s2+r	70
AR 101	s	100	s2+3	10
			r+1	40
			s2+1	20
			2	20
			3	10
AR 51	s	100	r+1	100
ZR0276-6-r (стійка)	r	100	r	100
ZR0276-12-r (стійка)	r	100	r	100
ZR0276-15-s (сприйнятлива)	s	100	s1	100
RZ2-P1a-s (сприйнятлива)	s	100	s2	100
RZ2-P2r-r (проміжна)	s+r	100	r	100
RZ2-F1-r (проміжна)	s+r	100	s2+r	100

Примітка: r — стійкий алель; s, s1 і s2 — сприйнятливі алелі; 1, 2... — інші алелі; x — адитивні неспецифічні фрагменти.

Rz, Можливо, їх стійкість обумовлена іншим геном(ами) або їх аналогами, у зв'язку з цим вони можуть представляти інтерес як джерела стійкості до ризоманії. Отримані результати вказують на необхідність уточнення генетичної природи стійкості і пошук специфічних маркерів для їх ідентифікації.

Перелік літератури

1. Роїк М. В., Нурмухаммедов А. К. Сучасний стан захворюваності цукрових буряків та шляхи її контролювання // Цукрові буряки. — 2002. — № 4. — С. 12–21.
2. Giunchedi L., De Biaggi M., Poggi P., Pollini C. Correlation between tolerance and beet necrotic yellow vein virus in sugar-beet genotypes // *Phytopathologia Mediterranea* — 1987. — 26. — P. 23–28.
3. E. Rhizomania in sugar beet — a threat to beet growing that can be overcome by plant breeding // *Sveriges Utsadesforenings Tidskrift*. — 1985. — 95. — P. 115–121.
4. Tamada T. Beet necrotic yellow vein virus // *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. — 1975. — № 144. — P. 4.
5. Saito M., Kiguchi T., Kusume T., Tamada T. Complete nucleotide sequence of the Japanese isolate S of beet necrotic yellow vein virus RNA and comparison with European isolates // *Arch Virol*. — 1996. — 141, № 11. — P. 2163–75.
6. Koenig R., Haeblerle A. M., Commandeur U. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugar beet growing area in Europe // *Arch. Virol*. — 1997. — 142. — P. 1499–1504.
7. Роїк М. В., Нурмухаммедов А. К., Васильєва Н.О. Особливості українського ізоляту вірусу некротичного пожовтіння жилок буряків // *Вісник аграрної науки*. — 2003. — № 12. — С. 22–24.
8. Koenig R., Lennfors B. L. Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan // *Archives of Virology*. — 2000. — 145, № 8. — P. 1561–1570.
9. Heijbroek W., Musters P. M. S., Schoone A. H. L. Variation in pathogenicity and multiplication of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in relation to the resistance of sugar-beet cultivars // *European Journal of Plant Pathology* 1999. — V. 105. — P. 397–405.
10. Abe H., Tamada T. Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. — 1986. — 52. — P. 235–247.
11. Brunt A. A., Richards K.E. Biology and molecular biology of furoviruses // *Adv. Virus Res.* — 1989. — 36. — P. 1–32.
12. Власов Д.Ю. Цикл розвитку *Polymyxa betae* Keskin / *Микология и фитопатология*. — 1986. — Т.20. — Вып.5. — С. 350–353.
13. Keskin B. *Polymyxa betae* n.spp., ein Parasit in der Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe // *Archiv für Mikrobiologie*. — 1964. — 49. — S. 348–374.
14. Canova A. Appunti di patologia della barbabietola // *Inform-atore Fitopatologico*. — 1959. — 9. — P.390–396.
15. Schaufele W.R. Die virose Wurzelbartigkeit (rizomania) der Zuckerrübe — Resistenzzüchtung entschärft ein problem // *Gesunde Pflanzen*. — 1989. — 41. — P. 129–136.
16. Bee P. A continental view of rhizomania // *Brit. Sugar Beet Rev.* — 1999. — 67, № 1. — P. 28–30.
17. Власов Ю.И., Ларина Э. И., Высоцкая Р.И., Кременцова Е.А. Идентификация вируса некротического пожелтения жилок свеклы — возбудителя ризомании // *Бюлл. Всесозн. НИИ защиты растений*. — 1985. — № 62. — С.38–43.
18. Роїк Н.В., Нурмухаммедов А.К., Васильєва Н.А., Костенюк Н.Н., Петриченко С.Н., Хельман Л.В. Ризоманія в Україні // *Труды Всероссий. конфер. "Сельскохозяйственная микробиология в XIX–XXI веках"*. — Санкт-Петербург: ВНИИСХМ. — 2001. — С. 71.

19. *Poik M. V., Nurmukhammedov A. K., Васильєва Н. О., Костенюк Н. М.* Проблема ризоманії цукрових буряків в Україні // Вісник аграрної науки.— 2001.— №10.— С. 21–24.
20. *Poik M. V., Nurmukhammedov A. K., Корнієнко А. С.* Хвороби коренеплодів цукрових буряків: коренеїд сходів, гнилі коренеплодів у період вегетації, ризоманія, непаразитні хвороби.— Київ: "ПоліграфКонсалтинг", 2004.— 213 с.
21. *Rother B.* Rhizomania in Europe // IIRB info.— 1998.— №3.— P. 14–17.
22. *Abe H., Tamada T.* A test tube culture system for multiplication of Polymyxa betae and beet necrotic yellow vein virus in rootlets of sugar beet // Proc. Sugar Beet Res. Assoc. Japan — 1987.— 29.— P. 34–38.
23. *Paul H., Henken B., Alderlieste M. F. J.* A greenhouse test for screening sugar beet (*Beta vulgaris*) for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYV) // Neth. J Plant Pathol.— 1992.— 98.— P. 65–75.
24. *Yoshitery S., Katusu T., Hisakuzu S., Atsushi S.* Characteristics of a new rhizomania resistant beet variety "Molino" // Proc. Jap. Soc. Sugar Beet Technol.— 2000.— № 41.— P. 25–30.
25. *Poik M. V., Nurmukhammedov A. K., Манько О. А.* Перспективи селекції цукрових буряків на стійкість до ризоманії // Цукрові буряки.— 2001.— № 2.— С. 14.
26. *Bolz G., Koch G.* Aussichten der Resistenz-(toleranz)zuchtung im Rahmen der Bekämpfung der Rhizomania // Gesunde Pflanzen.— 1983.— 35.— P. 275–278.
27. *De Biaggi M.* Methodes de selection, un cas concret // Proc. 50th Con. IIRB, Brussels — 1987.— P. 157–163.
28. *Asher M. J. C., Mutasa-Goettgens E. D., Chwarszcynska D. M.* Rhizomania: The role of vectral and virus resistance: 60 Congr. Cambridge, 1–3 July 1997 // Inst. Int. Rech. Betteravieres.— Brussels.— 1997.— P. 389–393.
29. *Lewellen R., T.* Performance of near-isolines of sugar beet with resistance to rhizomania from different sources // Proc. 58-th Con. IIRB, Beaune.— 1995.— P. 83–92.
30. *Paul H., Henken B., Scholten O. E., De Bock Th. S. M., Lange W.* Variation in the level of infection with Polymyxa betae and its effect on infection with beet necrotic yellow vein virus in beet accessions of the sections Beta and Corollinae // Proc. 2nd Symp. Int. Work. Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Montreal, Canada.— 1993.— P. 133–136.
31. *Mesbah M., Scholten O. E., De Bock Theo S. M., Lange W.* Chromosome localization of genus for resistance in Beta species of the section Procumbens: 60 Congr. Cambridge, 1–3 July 1997 // Inst. Int. Rech. Betteravieres.— Brussels.— 1997.— P. 487–490.
32. *Buttner G., Frese L., Steinriicken G.* Selektion von Rhizomania-resistenzgenen aus Wildrüben (*Beta vulgaris* L.) // Proc. 58th Con. IIRB, Beanie.— 1995.— P. 101–111.
33. *Lethouwevrs J., Bleykasten C., Rosquin I., Denys P., De Brayne E., Guilley H., Richards K., Jonard G., Lefébvre M., Weyens G.* Sugar beet transformation for rhizomania resistance: Introduction and expression of different viral sequences: 60 Congr. Cambridge, 1–3 July 1997 // Inst. Int. Rech. Betteravieres.— Brussels.— 1997.— P. 491–495.
34. *Sikken G. W.* Biotechnologie bij vanderhave. Een interview met de heer C. Noome, hoofd research bij vanderhave // Maandblad Suiker Unie.— 1990.— 24.— P. 6–7.
35. *Smith H. G., Stevens M., Parton N. J., Hallsworth P. B.* Assessment of risks associated with the release of transgenic sugar beet expressing viral gene sequences: 60 Congr. Cambridge, 1–3 July 1997 // Inst. Int. Rech. Betteravieres.— Brussels.— 1997.— P. 549–552.
36. *Lewellen R. T.* Selection for resistance to rhizomania in sugar beet // Abst. 5th Int. Con. Plant Pathol., Kyoto, Japan.— 1988.— P. 455.
37. *Scholten O. E., De Bock Th. S. M., Klein-Lankhorst R., Lange W.* Inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein

- virus in *Beta vulgaris*, conferred by a second gene for resistance // *Theor. App. Genet.*— 1999.— 99.— P. 740–746.
38. Redfearn M., Asher M. J. C. The development of molecular markers for evaluating disease resistance in *Beta* germplasm: 60 Congr. Cambridge, 1-3 July 1997 // *Inst. Int. Rech. Betteravieres.*— Brussels.— 1997.— P. 545–548.
39. Scholten O. E., Lange W. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review // *Euphytica.*— 2000.— 112.— P. 219–231.
40. Роїк М. В., Нурмухаммедов А. К., Васильєва Н. О., Шаюк Л. В., Білоус Н. В., Радченко В. П., Песцова Е., Schneider К. Пошук нових джерел стійкості цукрових буряків до ризоманії // *Збірник наукових праць ІЦБ УААН.*— К.: 2005.— Вип. 8.— С. 395–400.

Представлено В. А. Кунахом
Надійшла 30.11.2006

РИЗОМАНИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ И МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ УСТОЙЧИВЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Н. В. Роик, А. К. Нурмухаммедов,
Н. О. Васильєва

Институт сахарной свеклы УААН,
Украина, 03141, Киев, ул. Клиническая, 25
E-mail: isb@isb.kiev.ua

В обзоре, посвященном проблеме ризомании, показаны достижения украинских ученых в исследовании биологии возбудителя этой болезни (ВНПЖС), ее переносчика (*Polymyxa betae*), в усовершенствовании методов оценки и создании устойчивых селекционных материалов сахарной

свеклы. Показаны особенности передачи признака устойчивости к ризомании от диких форм свеклы посредством беккроссных скрещиваний, распределение признака в потомствах, создана генетическая коллекция устойчивых форм. Посредством молекулярно-генетических маркеров отобраны линии сахарной свеклы, устойчивость которых к ризомании обусловлена геном (генами), отличным от известного гена устойчивости *Rz*.

Ключевые слова: сахарная свекла, ризомания, устойчивость, беккроссные скрещивания.

RHIZOMANIA OF SUGAR BEET AND METHODS OF DEVELOPMENT OF RESISTANT BREEDING MATERIALS

M. V. Roik, A. K. Nurmuhammedov,
N. O. Vasileva

Institute of Sugar Beet UAAS,
Ukraine, 03141, Kiev, Clinichna str., 25,
E-mail: isb@isb.kiev.ua

The review deals with the problem of rhizomania with achievements of Ukrainian scientists in research of biology of causal agent of this disease (BNYV), its transmitting organism (*Polymyxa betae*), in perfecting of methods of evaluation and development of resistant breeding materials of sugar beet. Features of transferring the character of resistance to rhizomania from wild forms of beet through by backcrosses, distribution of the character in progenies are shown, a genetic collection of resistant forms was created. Through molecular-genetic markers, sugar beet lines were developed, in which resistant to rhizomania is conditioned with gene (genes) differing from the known gene of resistance *Rz*.

Key words: sugar beet, rhizomania, resistance, backcrosses.

**АКАДЕМІК МИКОЛА ІВАНОВИЧ ВАВИЛОВ
І ПОЛТАВЩИНА: ФАКТИ. ДОКУМЕНТИ.
БІБЛІОГРАФІЯ. УКЛАД. САМОРОДОВ В.М.,
ХАЛИМОН О.В.**

Наук. ред. В.А. Вергунов. — Полтава: Верстка, 2005. — 180 с.

Укладачі видання — відомий серед науковців і викладачів сільськогосподарських і біологічних вищих навчальних закладів доцент Полтавської державної аграрної академії, голова Полтавського відділення Українського ботанічного товариства, лауреат премії Президії Національної академії наук України ім. Л.П. Симиренка Самородов В. М. та старший науковий співробітник Полтавського краєзнавчого музею Халимон О. В. Як зазначають укладачі, видання приурочено до 95-річчя першого приїзду М.І. Вавилова в Полтаву, отже, і в Україну. Важливо і те, що ця книжка, як і збірка історико-наукових нарисів, документів, бібліографічних матеріалів, "Академік Микола Іванович Вавилов і розвиток аграрної науки в Україні. К.: Аграрна наука, 2005. — 578 с.", видана до 75-річчя створення Української академії аграрних наук, побачили світ у переддень 120-річчя вченого, яке світова спільнота відмічатиме у наступному 2007 році. Високе ставлення та глибока пошана до пам'яті М.І. Вавилова стали традиційними в Україні, адже різноманітна творча діяльність ученого тісно пов'язана з Україною з перших кроків його наукових пошуків, саме в Україні побачили світ його перші друковані праці.

Полтавська книжка про світового генія є, власне, описом Фонду академіка М.І. Вавилова, започаткованого в Полтавському краєзнавчому музеї у 1987 році, який з нагоди святкування 100-річчя вченого за рішенням ЮНЕСКО був оголошений "Роком Вавилова". Викладенню основного матеріалу передує чудовий портрет М.І. Вавилова з автографом. Невеличке "Передне слово" написав науковий редактор — директор державної наукової сільськогосподарської бібліотеки УААН, доктор сільськогосподарських наук, професор В.А. Вергунов. Власне текст книжки містить чотири розділи.

Розділ 1. Полтавські мотиви в професійній діяльності академіка М.І. Вавилова, як і останній — Розділ 4. Література про зв'язки академіка М.І. Вавилова з Полтавщиною, укладені В.М. Самородовим. Перший розділ є викладом нотаток про перебування М.І. Вавилова на Полтавській дослідній сільськогосподарській станції, спогади її співробітників і самого вче-

ного про вплив цього спілкування на формування його агрономічного світосприйняття. Пізніше М.І. Вавилов пишався тим, що є агрономом і до кінця життя мріяв "нагодувати людство", а хіба не ця мета є ціллю життя кожного агронома? Доречно, хоч і досить коротко, згадує укладач про неминущу пам'ять полтавців. Це, наприклад, перша в Україні меморіальна дошка на головному корпусі Полтавської державної дослідної сільськогосподарської станції, установлена в 1977 р., вперше ініційоване полтавцями видання ювілейних значків до 90- і 100-річчя вченого; відкриття пам'ятника на території Полтавської державної аграрної академії у 2002 р.

У розділі 2 коротко описано історію створення та сучасний стан Фонду академіка М.І. Вавилова. У Полтавському музеї він існує разом з фондами вчених-природознавців В.В. Докучаєва, В.І. Вернадського, В.О. Квасницького та деяких інших. За майже чверть століття Фонд академіка М.І. Вавилова постійно розширюється, нараховуючи нині понад 600 одиниць. Ця унікальна в Україні колекція містить наукові праці вченого, спогади про нього, ювілейні значки, медалі, конверти і марки з зображенням М.І. Вавилова, численні публікації про його життя і діяльність, увічнення пам'яті, матеріали наукових читань, ювілейних заходів, конференцій, фотовідбитки та негативи тощо. Надсилали до Полтави матеріали науковці з Москви, Санкт-Петербурга, Саратова. Зовсім недавно Фонд академіка М.І. Вавилова поповнився копіями фотографій, зроблених академіком власноруч під час експедицій (близько 120 одиниць).

Розділ 3 є головним — це тематичний каталог Фонду академіка М.І. Ва-

вилова, укладений за таким форматом: порядковий номер, облікове позначення, опис предмета, розмір, джерело та рік надходження. Саме ознайомившись з цим каталогом, користувач може легко орієнтуватись у структурі колекції та доцільно її використати.

Розділ 4 містить перелік бібліографічних описів 173 літературних джерел про зв'язки академіка М.І. Вавилова з Полтавщиною починаючи з 1910 до 2005 року. У книжці вміщено декілька фотографічних відбитків. На жаль, якість їх не є досконалою, до того ж під двома серед них є помітка "Публікується вперше", хоча вони уже представлені авторами у згаданій вище збірці, що підписана до друку тижнем раніше.

Гортаючи книжку "Академік Микола Іванович Вавилов і Полтавщина", розумієш величезну роль її укладачів у збиранні, опрацюванні, зберіганні і забезпеченні оперативного використання наукової спадщини вченого, що зробив свої перші кроки до всесвітнього визнання на Полтавській землі. Їхня праця є прикладом для нас, українських вчених, які усі разом зробили ще так мало для увічнення пам'яті, як і активного залучення до сучасної науки спадщини науковців, що плідно працювали на благо України.

При прочитанні книжки стає зрозумілим: немало зусиль, докладених М.І. Вавиловим для розвитку сільськогосподарської науки Полтавщини, проростають паростками увічнення його імені. Зрозуміло, що зроблене полтавцями складає дуже конкретний доробок, проте геній Миколи Івановича Вавилова, його праці, його блискуча особистість завжди будуть у вдячній пам'яті людства.

Р. І. Бурда

В. А. КУНАХ “БІОТЕХНОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН. ГЕНЕТИЧНІ ТА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ”

К. Логос, 2005 р., 730 с.

Уже минуло більше року, як вийшла друком названа монографія, присвячена актуальному напрямку сучасної біотехнології, у якому автор плідно працює понад 30 років. Вона ввібрала як власний досвід і результати автора, так і надбання світової науки у галузі біотехнології культурних рослин та лікарських рослин — представників природної флори. Ця монографія є актуальною і важливою для спеціалістів-біологів: сформованих вчених, аспірантів і молодих науковців, вона буде корисною і для студентів старших курсів та вчителів.

Складається монографія з трьох частин, які включають 21 розділ, словник та понад 1300 літературних посилань.

У вступі коротко охарактеризовано деякі поняття та наведено сучасний стан клітинної біотехнології, перспективи розвитку біотехнології лікарських рослин та фітопрепаратів.

Важливим для розуміння викладеного матеріалу є розділ 1, у якому висвітлено коротку історію, сучасний стан та перспективи застосування культури тканин лікарських рослин; досить детально описано здобутки вітчизняних вчених у цій галузі, коротко охарактеризовано українські наукові школи у цій галузі знань.

У розділі 2 викладено й охарактеризовано основні напрями сучасної біотехнології рослин, розглянуто сучасний стан клітинних та ДНК-технологій, а також створення і використання трансгенних рослин як джерела фармакологічно важливих сполук, у тому числі й білків та вакцин.

Розділ 3 присвячено характеристиці біологічно активних речовин рослин — як продуктів первинного метаболізму та їх похідних, так і речовин спеціалізованого обміну. Розглянуто сучасну класифікацію та приклади застосування цих сполук у фармацевтиці та харчовій промисловості.

Розділи 4–8 є викладом генетичних, цитогенетичних та фізіологічних особливостей основи біотехнології рослин – соматичних клітин у природі та в культурі *in vitro*. Розглянуто не лише мінливість клітинного геному, а й такі процеси, як дедиференціювання, калюсоутворення, морфогенез та регенерація *in vitro*, особливості формування та функціонування культури клітин як біологічної системи. Велику увагу приділено аналізу

результатів із вивчення впливу деяких регуляторів росту та вірусів на процеси мінливості та добору в клітинних популяціях.

У цілому загальна частина (розділи 1–9) представляє собою узагальнення генетичних та фізіолого-біохімічних основ біотехнології не лише лікарських, а й інших видів рослин, перш за все культурних.

Спеціальну частину, зокрема розділи 10–18, представляють результати досліджень культури клітин і тканин різних видів лікарських рослин. Тут аналізуються дані, отримані переважно автором та співробітниками лабораторії, яку він очолює. Досить цікавим є узагальнення досліджень з культурою тканин раувольфії, де автор наводить унікальні результати з отримання клітинних штамів-продуцентів та їх вивчення в лабораторних та промислових умовах вирощування. Не менш цікавими й важливими є розділи, присвячені арнебії барвній, маку снодійному та приквітниковому, женьшеню, елеутерококу, родіолі рожевій, унгернії Віктора тощо. У розділі 19 наведено результати досліджень антимутагенної та протекторної активності екстрактів культури тканин деяких лікарських рослин, отримані переважно автором із колегами.

Спеціальна частина монографії закінчується підсумковим 20-м розділом, в якому автор викладає власні узагальнення з особливостей клітинних штамів-продуцентів різних видів лікарських рос-

лин та регуляції синтезу біологічно активних речовин в культурі тканини.

Прикінцева частина містить один розділ, в якому автор узагальнює сучасні дані про тривалість життя людини, основні захворювання, що нині зумовлюють смертність, шляхи профілактики і лікування основних хвороб та роль у цих процесах сучасних напрямів біотехнології рослин.

Справді хороша і корисна книжка не позбавлена деяких вад. Зокрема, автор досить часто користується термінами "ростовий індекс" або "індекс росту". Зрозуміло, що цей показник є віднесенням до якоїсь початкової величини. Але, на жаль, рецензент, навіть за властивої йому прискіпливості, у тексті не знайшов тлумачення цих термінів (до речі, сподіваюсь, що два терміни є синонімами, і тому краще було б вживати один із них). Подібне зауваження стосується паралельного вживання термінів "індоліновий" і "індольний" без пояснення різниці між ними, а також термінів "накопичення"/ "нагромадження". До недоліків я відніс би певну перенасиченість деяких розділів "частотолами" — графічними зображеннями динаміки мітотичної активності як модельних, так і технологічно значимих рослин.

Відзначені зауваження зроблені, так би мовити, "на перспективу", бо сподіваюся, що за першим виданням буде і друге... Рецензована ж монографія, переконаний, матиме свого читача і успіх.

С. С. Малюта

ПРОФЕСОР П. О. СІТЬКО — ФУНДАТОР ТА УЧАСНИК ВІДРОДЖЕННЯ ГЕНЕТИКИ В УКРАЇНІ (до 100-ліття від дня народження)

В. А. КУНАХ, Т. Г. ТІТОК

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
E-mail: kunakh@imba.org.ua

1948–1960-ті роки в СРСР були роками мракобісся у біологічній науці. Особливо це було характерно для української науки. Протягом цих років у вищих навчальних закладах такої дисципліни, як генетика, практично не було. Студентам викладали її викривлені ненаукові сурогати, такі як мічурінська біологія та модифікований під потреби політичних догм дарвінізм. Це був один з наслідків проведеної у 1948 р. в м. Москва недоброї пам'яті серпневої сесії ВАСГНІЛ “Про положення у біологічній науці” і у тому ж місяці — її карликової копії в Україні, постановою якої генетика як наука в СРСР була практично заборошена. Сесія була спланована і проведена не як дискусія, а як “парад переможців пролетарської науки”, була трибуною, з якої група демагогів і пристосуванців на чолі з Лисенком та Презентом з позицій пануючої ідеології і так званої мічурінської біології завершили розгром класичної генетики.



Генетики і більшість співчуваючих їм біологів були звільнені і залишилися без роботи. Тільки з вищих навчальних закладів за наказом міністра вищої освіти було звільнено 127 викладачів, у тому числі 66 професорів. Наприклад, лише з Київського державного університету ім. Т. Г. Шевченка були звільнені професори С. М. Гершензон, І. І. Шмальгаузен, Л. М. Дельне, М. М. Гришко. Викладання генетики було припинено, книги вилучались з бібліотек і знищувались.

У Київському державному університеті ім. Т. Г. Шевченка до 1948 р. функціонували дві генетичні кафедри. Кафедру дарвінізму і генетики, організовану в 1934 р. академіками І. І. Шмальгаузенем і І. Й. Аголом, з

1937 р. очолював професор С. М. Гершензон. Кафедру генетики і селекції рослин з 1944 р. очолював академік М. М. Гришко. У 1948 р. обидві кафедри були розформовані. Лише у 1963 р. було відновлено кафедру генетики і селекції. Проте і тут все ще панували "творчий дарвінізм" та "мічурінська біологія". І навіть після жовтневого 1964 р. Пленуму ЦК КПРС, коли класична генетика була реабілітована, викладання було непрофесійним. Лекції з генетики читав "біолог-марксист" (назва тодішньої стінгазети біологічного факультету). На початку 1965 р. студенти другого курсу біологічного факультету провели збори, на яких звернулись до ректора Київського державного університету з проханням замінити викладача генетики, оскільки рівень викладання, навіть на думку студентів-другокурсників, був украй слабким і непрофесійним. І у березні 1965 р. генетику для студентів-біологів університету знову, через 17 років, повернувся читати професор П. О. Сітько. З великою увагою і задоволенням студенти слухали високопрофесійні лекції цього зовні милого і добродушного професора, який виявився хоч і доброзичливим, але суворим екзаменатором. Своїми знаннями з генетики всі випускники 1968–1970 рр. біологічного факультету, перш за все кафедри генетики, завдячують саме Паньку Онуфрійовичу, який ще довго читав спецкурси на кафедрі генетики і селекції (нині кафедра загальної і молекулярної генетики). І саме першу половину 1965 р. слід вважати датою відродження сучасної генетики у Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка, яке (відродження) започаткував глибокошанований Панько Онуфрійович.

Видатний учений, педагог, доктор біологічних наук, професор, один з перших за освітою і фахом українських генетиків Панько (Пантелеймон) Онуфрійович Сітько народився у селянській родині 9 серпня 1906 р. на Київщині в селі Ксаверівка Васильківського району. В скрутний післяреволюційний час сільська школа рекомендує свого найкращого і здібного випускника Панька Сітька для подальшого навчання. Він вступає до Білоцерківського сільськогосподарського технікуму, після закінчення якого в 1925 р. як кращий випускник направляється для продовження навчання до Київського інституту народної освіти (тепер — Київський національний університет ім. Тараса Шевченка).

Свою наукову діяльність Панько Онуфрійович розпочав студентом на біологічному факультеті університету, де він спеціалізувався на кафедрі експериментальної зоології, яку очолював І. І. Шмальгаузен, вивчав вплив екстремальних температур на мутабельність дрозофіли. Після закінчення навчання у 1929 р. працював в Інституті зоології НАН України. У цьому ж 1929 р. молодого дослідника, за рекомендацією І. І. Шмальгаузена, було відряджено для участі у 1-му Всесоюзному з'їзді генетиків і селекціонерів, який відбувся у Ленінграді (нині Санкт-Петербург). Цей з'їзд справив незабутнє враження на Панька Онуфрійовича і остаточно вплинув на вибір напряму його наукових досліджень. Він вступає до аспірантури при Академії наук України у відділ експериментальної зоології, яким керував І. І. Шмальгаузен. Панько Сітько став першим аспірантом з генетики в Академії наук УРСР.

Під науковим керівництвом спочатку І. І. Шмальгаузена, потім І. Й. Агола, П. О. Сітько вивчав зміни та виникнення мутацій у дрозофіли під дією рентгенівського опромінення. Була виявлена залежність мутабельності від геному організмів та його варіювання в природних популяціях. Шляхом інтродукції в природу мутантних форм було показано вплив на них природного добору, а також вплив на добір мутацій змін навколишнього середовища в результаті діяльності людини. П. О. Сітько став відомим вченим з питань радіаційної генетики, одним із перших дрозофілістів у СРСР. За результатами наукових досліджень у 1932 р. він захистив кандидатську дисертацію "Залежність мутабельності від генотипу". У 1934 р. очолив новостворену лабораторію генетики в Інституті зоології АН УРСР, яка входила до відділу, яким керував спочатку вчитель П. О. Сітька І. І. Шмальгаузен, потім І. Й. Агол. У цьому ж році в Київському університеті була організована кафедра дарвінізму і генетики, на якій П. О. Сітько викладав генетику.

У 1937 р. після арешту й розстрілу академіка І. Й. Агола відділ генетики інституту зоології, до якого входила й лабораторія під орудою П. О. Сітька, очолив С. М. Гершензон. У цьому відділі у 1938–1939 рр. вперше у світі було виявлено мутагенну дію ДНК. Цю дію виявили М. Д. Тарнавський, П. О. Сітько та С. М. Гершензон.

Наукову і викладацьку роботу Панька Онуфрійовича перервала війна 1941–1945 рр. Незважаючи на "броню" та відсутність військової підготовки, П. О. Сітько з перших днів війни добровольцем пішов на фронт. У Київсько-

му оточенні був поранений, утік із полону і до звільнення України від німецьких загарбників воював у партизанських загонах України та Білорусії.

У повоєнний період П. О. Сітько повернувся до Інституту зоології, викладав генетику у Київському університеті, продовжував генетичні дослідження. Результати власних досліджень мутабельності дрозофіли він узагальнив у монографії "Проблеми еволюції мутабельності", яку було у 1948 р. представлено як докторську дисертацію. Проте внаслідок подій після серпневої 1948 р. сесії ВАСГНІЛ захист не відбувся.

З 1948 року, внаслідок відомих трагічних подій в біології, розвиток генетики в країні зупинився. Кафедра генетики Київського університету була перейменована в мічурінську кафедру дарвінізму й генетики, співробітники звільнені. Дозволялося займатися лише селекційною роботою. Панько Онуфрійович продовжував працювати в цей період в Інституті зоології, він зумів поєднати проблеми селекції з розробкою фундаментальних питань генетики, розпочав генетичні та селекційні дослідження з дубовим та тютювим шовкунами. Вперше розробив методи племінної роботи і селекції, вивів породи ІЗАН-1 та ІЗАН-4 дубового шовкуна з високою продуктивністю та якістю коконів, які були впроваджені у виробництво. П. О. Сітько одержав авторське свідоцтво та був нагороджений Держкомітетом Ради Міністрів СРСР медаллю за успішну роботу та впровадження наукових здобутків у виробництво.

Розроблені Паньком Онуфрійовичем принципи і методи синтетичної селекції в шовківництві дозволили йому одержати складні міжпорідні гібриди у тютюво-

го шовкуна, які при раціональному підборі у ротаційній схемі схрещування дали високопродуктивні промислові породи — Київська СБ та Київська СЕ, які використовувались не тільки в нашій країні, а й за кордоном. У 1960 р. він захистив докторську дисертацію “Принципи і методи селекції племінної справи в шовківництві” у вигляді монографії.

З настанням кращих часів для розвитку біології, після 1964 р., генетика починає відроджуватись в Україні. Активну участь у цьому відродженні брав доктор біологічних наук П. О. Сітько. Він поєднує наукову працю з викладанням загальної генетики та спецкурсів з генетики в Київському університеті ім. Т. Г. Шевченка, керує роботою аспірантів і дипломників.

З ініціативи видатного українського вченого, члена-кореспондента АН УРСР, лауреата Ленінської премії В. П. Зосимовича, який очолював Наукову раду АН УРСР з проблем генетики і селекції, у 1967 р. було створено Сектор генетики при Академії наук, який включав три відділи — генетики рослин (зав. В. П. Зосимович), генетики тварин (зав. М. М. Колесник, до складу якого входив і д. б. н. П. О. Сітько) та новостворений відділ експериментального мутагенезу. У цьому відділі Сектор генетики очолив запрошений з ініціативи В. П. Зосимовича з Інституту цитології і генетики Сибірського відділення АН СРСР П. К. Шкварніков. Сектор генетики у 1968 р. було реорганізовано у Сектор молекулярної біології і генетики, а у 1973 р. — в Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, пер-

шим директором якого був С. М. Гершензон.

Доктор біологічних наук П. О. Сітько у 1967 р. перейшов працювати у відділ генетики тварин і очолив групу науковців з вивчення генетичних механізмів гетерозису. В цей період Панько Онуфрійович бере безпосередню участь в організації Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, його обирають членом Президії товариства. Він організовує з'їзди генетиків, наукові конференції і семінари. Бере активну участь в організації наукового журналу “Цитологія і генетика”, був одним із його засновників і членом редколегії протягом більше 10 років.

Всі, хто знав і працював з Паньком Онуфрійовичем, глибоко шанували і цінували такі його людські якості, як доброзичливість, привітність, уважність. Він майже ніколи не відмовляв у проханнях і виконував їх, цікавився особистим життям співробітників та допомагав долати різні труднощі, що, на жаль, часто виникали у ті бурхливі роки. Принциповий учений, широко ерудований викладач, який ніколи не займався політикою, ухилявся від високих посад, простий, скромний, чуйний, глибоко порядний — таким залишився П. О. Сітько у пам'яті тих, кому пощастило знати його, слухати його лекції, учитись у нього, співпрацювати з ним.

Хай ці рядки будуть ще однією ознакою глибокої шани та пам'яті про Панька (Пантелеймона) Онуфрійовича Сітька — Ученого, Вчителя, великої і простої Людини на честь 100-ліття від дня його народження.

ПРОФЕСОР І. М. ПОЛЯКОВ — ВИДАТНИЙ УЧЕНИЙ І ІСТОРИК БІОЛОГІЧНОЇ НАУКИ

В. Т. МАНЗЮК

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва,
Україна, 61060, Харків, пр. Московський, 142

*"Наука покликана зробити працю
квіттороба продуктивнішою".*

К. А. Тімірязєв

Ілля Михайлович Поляков — класик біологічної науки. Головні напрямки його наукової діяльності — це роботи з історії еволюційного вчення і експериментальних досліджень в галузі біології і фізіології запилення — запліднення рослин, а також досліджень з генетики.



І. М. Поляков народився 16 вересня 1905 року в м. Харкові в сім'ї службовця. З дитинства він отримав ґрунтовну домашню освіту, досконально засвоїв головні європейські мови, особливо німецьку і французьку. У 1921 р. він закінчив загальноосвітній курс Харківського робочого політехнікуму і склав екзамени за середню школу. В цьому ж році вступив до Харківського інституту народної освіти (нині Харківський державний університет ім. Каразіна) на біологічний факультет, який закінчив у 1926 р. Починаючи з 1925 р. Ілля Михайлович пройшов шлях від асистента до завідуючого кафедрою Комуністичного університету ім. Артема, а у 1928–1931 рр. завідував кафедрою біології факультету соціальної освіти ХІНО. У 1930–1934 рр. працював за сумісництвом старшим науковим співробітником біологічної секції в Інституті філософії і природознавства ВУАМЛІ, а також завідував лабораторією генетики в Українському інституті експериментальної медицини. З 1930 р. І. М. Поляков очолював сектор еволюційної теорії і генетики в зоолого-біологічному інституті Харківського університету ім. О. М. Горького, а з 1933 р. — він професор кафедри генетики університету за сумісництвом (з 1936 р. — завідувач цієї ж кафедри). У 1934 р. І. М. Поляков був затверджений в

© В. Т. МАНЗЮК, 2006

науковому званні професора. Ступінь кандидата біологічних наук йому була присуджена в 1936 р. без захисту дисертації.

Той, хто уважно почне вивчати величезну наукову і літературну спадщину І. М. Полякова, повинен буде зробити неминучий висновок, що все життя і вся кипуча діяльність цього вченого-біолога були спрямовані на безкорисливе служіння науці. У цьому служінні виявилось незмінне прагнення пояснити явища природи, виявити все, що намагається знати людство, пояснити все живе, що вважалося таємницею. І в пропаганді і в популяризації наукових основ життя перед І. М. Поляковим завжди стояла одна і та ж мета — невтомно боротися з інертністю думки, з неучтвом. З 1924 по 1948 р. І. М. Поляковим було опубліковано 133 наукових праці. Серед них: "Сучасна еволюційна теорія", "Основи природознавства", "Загальна біологія", перший підручник з дарвінізму — "Курс дарвінізму". Низку праць цього періоду присвячено методологічному аналізу дарвінізму. Працюючи редактором відділу "Теорія еволюції" московського "Реферативного біологічного журналу", він опублікував 55 рецензій-рефератів на наукову іноземну і радянську літературу з питань дарвінізму і генетики.

Під час Великої Вітчизняної війни, у 1941–1944 рр. І. М. Поляков працював у Томському державному університеті ім. Н. В. Куйбишева завідуючим кафедрою зоології хребетних тварин. У 1942 р. Ілля Михайлович захистив докторську дисертацію. У 1944 р. його відкликають до Харківського державного університету ім. О. М. Горького, де він очолив кафедру дарвінізму і генетики, одно-

часно завідував відділом дарвінізму і генетики Зоологічного інституту при університеті. А з 1946 р., коли був організований інститут генетики і селекції АН УРСР, Ілля Михайлович очолив ще й лабораторію генетики цього інституту. У 1948 р. Ілля Михайлович Поляков був обраний членом-кореспондентом АН УРСР.

У цьому ж 1948 р., одержавши підтримку Сталіна, Т. Д. Лисенко організовує і проводить так звану "августовську" (серпневу) сесію ВАСГНІЛ "Про положення в біологічній науці". Ця сесія була спланована не як дискусія, а як "парад переможців" і стала трибуною для групи демагогів і пристосованців від науки на чолі з Лисенком, яка з позицій пануючої ідеології і так званої мічуринської біології завершила розгром класичної генетики. Тим не менш пролунали голоси незгідних на сесії. Це були, зокрема, генетики І. А. Рапопорт, С. І. Аліханян, А. Р. Жебрак, еволюціоністи І. І. Шмальгаузен, І. М. Поляков, рослинник П. М. Жуковський.

Цікавою є доповідь І. М. Полякова на восьмому засіданні цієї сесії: "... я тут не виходжу на трибуну робити реверанси, я сам протягом останніх років і мої найближчі співробітники працюємо в галузі вивчення важливої, поставленої Мічуріним на весь зріст проблеми вибіркового запліднення, працюємо експериментально. Немає часу детально говорити, але скажу про це в двох словах. Нам вдалося показати на цілому ряді об'єктів широке значення вибіркового запліднення, встановити зв'язок цього явища зі ступенями еволюційної внутрішньовидової дивергенції, вдалося, як мені здається, проаналізувати фізіологічні механізми цих

явищ, ті процеси, які відбуваються в пилкосуміші на певних материнських рослинах, вдалося показати, як часом невелика кількість потрібного пилку, який потрапляє до пилкосуміші, відіграє велику роль у процесі запліднення, і з'ясувати ще низку інших питань... Мені здається, що генетика і дарвінізм повинні розвиватися в нашій державі широким фронтом і потрібен цілий ряд напрямків, які відкривають цікаві і важливі фактори. Не треба від цих речей відмахуватися. Не варто так легко ставитися до цих напрямків”.

Після сесії більшість генетиків і співчуваючих біологів були звільнені і лишилися без роботи. Так, Ілля Михайлович Поляков був звільнений з усіх посад в Університеті і Інституті генетики і селекції. Правда, через деякий час Ілля Михайлович був поновлений на роботі в Інституті генетики і селекції, але вже на посаді старшого наукового співробітника, де він розгорнув експериментальні роботи з питань запліднення і розвитку рослин.

Запліднення — одна з кардинальних проблем ембріології — є традиційною в дослідженнях українських ембріологів. Відкриття С. Г. Навашиним у 1898 р. подвійного запліднення мало важливе значення для розвитку не тільки ембріології, а й усєї ботанічної науки. У працях С. Г. Навашина і його учнів було доведено універсальність процесу подвійного запліднення для покритонасінних, а також виявлені численні деталі його походження.

Детальні дослідження програмної фази запліднення проведені І. М. Поляковим і його співробітниками (1949–1970 рр.). Вони одержали багатий фактичний матеріал про вибірковість і множинність запліднення.

У 1952 р. вперше у світі І. М. Поляков запропонував застосовувати радіоактивні ізотопи в дослідженнях запліднення рослин, розробив методику таких досліджень. За допомогою радіоактивних ізотопів вивчався обмін речовин при заплідненні і визріванні насіння сільськогосподарських культур. Про ці дослідження І. М. Поляков доповідав на сесіях АН УРСР і АН СРСР, на міжнародних симпозіумах і конгресах в Парижі, Амстердамі, Гаазі. Його праці на цю тему друкувалися в Китаї, Румунії, НДР, інших країнах.

Вдало склалась кар'єра І. М. Полякова і як адміністратора. У 1955 р. він був призначений заступником директора з наукової роботи Інституту генетики і селекції АН УРСР, який очолював академік В. Я. Юр'єв, а в 1956 р. цей інститут було об'єднано з Харківською державною селекційною станцією і створено Український науково-дослідний інститут рослинництва, селекції та генетики, який очолював В. Я. Юр'єв — директор і І. М. Поляков — замісник з наукової роботи. А коли в 1962 р. В. Я. Юр'єв помер, директором став І. М. Поляков, а замісником з наукової роботи — В. Т. Манзюк.

Щоб охарактеризувати роботу адміністрації інституту, досить навести такий факт: І. М. Поляков, В. Т. Манзюк і заслужений агроном УРСР насінневод Б. М. Кононенко розробили і запровадили заходи, які дозволили збільшити площі, які займали сорти і гібриди селекції інституту з 2,5 млн га в 1962 р. до 13,5 млн га в 1972 р.

За ці роки було створено і передано у виробництво 44 сорти і гібрида сільськогосподарських культур. Серед них сорт ярої твердої пшениці Харківська 46, який висівався на площі

3,5 млн га у 39 областях, краях і автономних республіках Радянського Союзу (автори — П. В. Кучумов, Є. О. Ватуля). Понад 1 млн га в СРСР та близько 40% посівів в Україні займали три сорти озимого жита — Харківське 194, Харківське 56 і Харківське 60 (автори В. П. Пахомова, Б. М. Кононенко). Було створено нові високоврожайні сорти озимої м'якої пшениці — Крупноколоса, Харківська 159 і Харківська 63. Останній сорт, виведений В. І. Дідусем та М. О. Голубом, районувannya якого почалося з 1969 р., поєднує чудові якості сильних пшениць з високою врожайністю (до 70 ц/га). На площі близько 1,5 млн га вирощувались сорти ярого ячменю Європеум 353/133, Харківський 306 і Нутанс 58 (автори — В.Я. Юр'єв; Т.І. Дмитрієва; В. Т. Манзюк). Майже 6 млн га займали гібриди кукурудзи селекції інституту. Найпоширеніший з них — Буковинський ЗТВ (автор — В.О. Козубенко). У 1968 р. районовано гібриди Харківський 10 Т і Буковинський ЗТВ ранній (автори — В.О. Козубенко, Б.П. Гур'єв, Л.В. Козубенко, Б.М. Кононенко). Високу оцінку одержав кормовий горох Харківський 131, створений С.М. Фріденталь. Велике значення надається накопиченню, вивченню і практичному використанню зразків світової колекції. Лабораторія рослинних ресурсів вже мала до 30 тисяч сортозразків, одержаних від ВІРУ, інших науково-дослідних закладів і створених в інституті. Щорічно вивчалось 5–7 тисяч сортозразків озимої і ярої пшениці, озимого тритикале, озимого жита, ярого ячменю, кукурудзи (Л. М. Делоне, С. В. Рабинович, Г. А. Корольська, І. А. Гур'єва).

Усі агроприйоми вирощування озимої пшениці, кукурудзи, цукрових бу-

ряків і деяких інших сільськогосподарських культур у лівобережному Лісостепу України розроблено відділом рільництва, яким керував О. Ф. Глянцев. Особливо успішно проводились роботи з боротьби проти шведської і гессенської мух і такої хвороби, як склернія соняшника (О. В. Заговора, І. В. Гречка).

Розроблено норми відбору насіння при сортуванні з врахуванням ваги 1000 зерен, енергії проростання, схожості, сили росту і процента травмування. Цей метод дає змогу відібрати при сортуванні повноцінне насіння, врожай з якого на 3–3,5 ц/га вищий (І. Г. Строна).

Роботи з вивчення запліднення і цитоплазматичної чоловічої стерильності у сільськогосподарських рослин очолював І. М. Поляков. Таку стерильність виявлено в ярого жита. У великому обсязі проводили роботи зі створення ліній закріплювачів стерильності й відновників фертильності, вивчали їх комбінаційну цінність. Цим закладено основу використання гетерозису в жита (А. П. Здрилько).

У великих масштабах виконано роботи з вивчення фізіолого-біохімічних особливостей рослин з цитоплазматичною чоловічою стерильністю. У кукурудзи, жита і сорго досліджуються амінокислотний, білковий і нуклеїновий обмін, ферментативні системи. Виявлено деякі відмінності обміну речовин у пилку закріплювачів стерильності й відновників фертильності. В останніх пилках відзначається вищим рівнем обміну речовин (О. М. Дмитрієва).

В інституті проводили дослідження гетерозису в кукурудзи, спрямовані на створення самозапильних ліній з високою комбінаційною здатністю, розроб-

ляли методи підбору компонентів при створенні високоврожайних гібридних популяцій. Роботи З. І. Щолокової показали, що, використовуючи суміші насіння різних ліній і гібридів кукурудзи, можливо створити популяцію, яка за врожайністю не поступається перед районованими подвійними міжлінійними і сортолінійними гібридами.

Встановлено, що гетерозисні гібриди кукурудзи порівняно до негетерозисних і самозапильних ліній характеризуються вищою активністю фізіологічно активних речовин групи "В". Досліді показали, що суміш екстрактів з насіння батьківських самозапильних ліній має активність речовин групи "В" таку ж, як екстракти з насіння гібридів, одержаних при схрещуванні цих ліній. На підставі цього С. Г. Манзюк розроблено методику лабораторного прогнозування можливості проявлення гетерозису. При польових випробуваннях прогноз підтверджується на 70–81%.

У лабораторії генетики інституту досліджували віддалену гібридизацію рослин. У результаті міжвидової гібридизації до 1974 р. одержано три сорти, які передано до Державного сортопробування. Створено пшенично-житні 42 і 56-хромосомні амфідиплоїди тритикале. Серед 42-хромосомних амфідиплоїдів виділено високозимостійкі лінії з добре озерненим колосом і майже нормальним зерном (А. Ф. Шуліндін, О. О. Потапова, Л. М. Наумова). У результаті віддаленої гібридизації культурного високопродуктивного соняшника з дикими видами створено гібридні форми, які за врожайністю насіння і олії не поступаються перед районованим сортом і на 100% стійкі проти вовчка і склеротинії (В. Г. Вольф).

Досягнення вчених інституту привели до того, що інститут рослинництва, селекції і генетики ім. В. Я. Юр'єва став провідним центром у СРСР з насінництва і одним із крупних селекційних центрів. До його складу входили Чернігівська, Донецька, Ворошиловградська обласні дослідні станції, Весело-Подільська дослідно-селекційна станція ВНІС.

У 1949–1952 рр. І. М. Поляков був прикомандирований до відділення біологічних наук АН СРСР і працював в Головній редакції творів Ч. Дарвіна. За цей час було підготовлено до друку 4-й–6-й томи. У цих томах опубліковані статті І. М. Полякова "Забарвлення статі у деяких метеликів", "Про змінення однієї раси сирийських вуличних собак шляхом статевого добору", "Походження людини і статевий добір", "Проблема запліднення рослин у її історичному розвитку", "Різноманітні пристосування, за допомогою яких орхідеї запилюються комахами", "Дія перекресного запилення і самозапилення у рослинному світі".

У 1952 р. І. М. Поляков і А. П. Бердишев видали "Вибрані твори з агрономії, плодівництва, лісівництва і ботаніки" А. Т. Болотова. Їм належить редакція книги, вступна стаття "А. Т. Болотов і його праці в галузі біологічної і сільськогосподарської науки", коментарі до неї, бібліографія праць А. Т. Болотова і література про нього.

У період 1950–1970 рр. І. М. Поляков брав активну участь у виданні праць класиків природознавства XVIII–XX століть. Крім того, він займався ламаркізмом з 1930 по 1972 р. і опублікував близько 30 праць, у тому числі книгу про Ламарка, а також статті "Ламар-

кізм" і "Методологія ламаркізму". Остання була представлена на Всесоюзному з'їзді зоологів у Києві в 1930 р.

У 1955–1959 рр. під загальною редакцією І. М. Полякова і Н. І. Нухдіна було видано "Вибрані праці в двох томах" Ж.-Б. Ламарка. І. М. Поляков написав докладні примітки до "Вступних лекцій з курсу зоології" і "Філософії зоології". У цьому виданні, до речі, стараннями І. М. Полякова, а також директора Національного музею природознавчої історії в Парижі, академіка Р. Гойма і бібліотекаря М. Мосьє, були вперше опубліковані дві праці Ламарка "Аналітичний огляд людських знань" і "Вступна лекція до курсу зоології". Крім приміток, І. М. Поляков опублікував у другому томі дві статті — "Еволюційне вчення Ламарка, його філософські і загальнобіологічні передумови" і "Важливіші дати життя і творчості Жана-Батіста Ламарка".

І. М. Поляков відредагував, написав статтю і примітки, склав поіменні вказівки до 4-го тому "Академічної збірки праць" І.І. Мечникова. В статті "Розробка основних проблем дарвінізму в працях І.І. Мечникова" І. М. Поляков пише, що праці І.І. Мечникова повинні бути захищені до класичних творів з дарвінізму. За І.І. Мечниковим принципи дарвінізму можуть бути застосовані в різних галузях біології і медицини. Вони мають велике значення для світової науки.

У 1960 р. під редакцією І. М. Полякова вийшла з друку фундаментальна праця (двотомник) В.В. Лункевича "Від Геракліта до Дарвіна, нарис з історії біології". До 32-х глав першого тому Ілля Михайлович написав 148, а до 22-х глав другого тому — 90 приміток. Його примітки — це доповнення, виправлен-

ня, дискусія з автором з деяких питань, котрі збагатили широкий за змістом і охопленням матеріал з історії біології, написаний В. В. Лункевичем.

У 1967 р. І. М. Поляков як член редколегії брав участь у виданні фундаментальної праці "Розвиток біології в СРСР", виданої відділенням загальної біології АН СРСР.

У 1972 р. в Інституті історії природознавства і техніки було видано книгу "Історія біології з стародавніх часів до початку XX століття". У цій книзі Іллею Михайловичем написано частину другої "Розширення і систематизація біологічних знань в XV–XVIII віках", яка складається з 10 розділів.

Праці І. М. Полякова — монографії, статті, виступи на різних форумах, зробили величезний внесок до теорії і практики досліджень, залучали нових adeptів універсального вчення про життя у всіх його проявах. Протягом 1949–1978 рр. він опублікував 87 експериментальних робіт. У 1962–1974 рр. І. М. Поляков був головним редактором науково-тематичного збірника "Селекція і семеноводство".

І. М. Поляков відзначався надзвичайною широтою наукових інтересів, багатогранністю і різноманітністю досліджень в поєднанні з надзвичайною ретельністю експериментів і глибиною узагальнень. Можна сміливо сказати, що за сучасної спеціалізації науки знайдеться небагато біологів з подібним діапазоном творчості.

Поряд з великою науково-дослідною роботою І. М. Поляков багато часу приділяв підготовці кадрів. Ним підготовлено 7 докторів і 17 кандидатів наук.

У 1965 р. І. М. Полякову було присвоєно почесне звання Заслуженого діяча на-

уки УРСР, у 1966 р. він був відзначений Золотою медаллю ВДНГ СРСР.

Ав 1967 р., як директора Інституту, за виведення нових сортів і гібридів сільськогосподарських культур, розробку системи насінництва з виробництва елітного насіння і використання її в колгоспах і радгоспах Комітет ради Виставки досягнень народного господарства СРСР нагородив І. М. Полякова Почесним дипломом.

У 1969 р. Президія АН УРСР присудила І. М. Полякову премію ім. В. Я. Юр'єва за цикл праць із вивчення процесів запилення і запліднення сільськогосподарських рослин, обґрунтування нових методів дослідження в цій галузі і використання одержаних даних в практиці гібридизації рослин.

І. М. Поляков нагороджений орденом "Красной Звезды", медаллю "За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг."

За успіхи в розвитку сільськогосподарської науки І. М. Поляков нагороджений двома орденами "Знак Почета" (1966, 1971 рр.), медаллю "За доблестный труд" (1970).

Професор І. М. Поляков був одним із фундаторів Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, обирався членом Президії товариства та головою Харківського відділення цього товариства. Був депутатом Харківської обласної Ради п'яти скликань (1962–1972 рр.), очолював постійну комісію з захисту природи.

У 1972 р. за вказівкою Харківського обкому КПУ Ілля Михайлович подав заяву про звільнення з посади директора "за власним бажанням" і був переведений на посаду наукового співробітника — консультанта Українського науководослідного інституту рослинництва, селекції та генетики ім. В. Я. Юр'єва.

В історії світової науки Ілля Михайлович Поляков по праву займає виключне місце, увійшовши до неї як один з видатних рослинників, ботаніків, як першокласний біолог-еволюціоніст, глибокий мислитель-теоретик, видатний державний і громадський діяч, блискучий генетик і селекціонер, чудовий організатор науки. Він був доброю, чуйною людиною.

Помер Ілля Михайлович Поляков 4 листопада 1976 року.

В'ЯЧЕСЛАВ ГРИГОРОВИЧ МИХАЙЛОВ

(до 70-ліття від дня народження)



У 2006 р. виповнилося 70 років від дня народження доктора сільськогосподарських наук, професора, члена-кореспондента УААН, віце-президента Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, члена редколегії журналу "Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів" В'ячеслава Григоровича Михайлова.

В. Г. Михайлов народився 4 жовтня 1936 р. у м. Умані Черкаської області. Після закінчення середньої школи у 1955 р. поступив до Уманського сільськогосподарського інституту, який закінчив у 1960 р. Після закінчення

інституту працював агрономом у радгоспі "Кам'янка" Запорізької області, потім на Запорізькій дослідній станції у відділі селекції.

У 1963–1966 рр. навчався в аспірантурі Інституту землеробства УААН, після закінчення якої працював тут спочатку молодшим науковим співробітником, потім старшим, головним науковим співробітником, завідувачем лабораторії селекції сої, заступником директора із селекційної роботи. Коло наукових інтересів є широким — це генетика, селекція, насінництво, сортова технологія вирощування сільськогосподарських культур.

Кандидатську дисертацію "Мінливість біологічних і господарсько-цінних ознак сої в північному Лісостепу України" захистив у 1966 р. в Селекційно-генетичному інституті на тему, докторську "Генетичні основи селекції скоростиглих сортів сої" — у 1987 р. в Інституті рослинництва. У 1992 р. В. Г. Михайлову присвоєно звання професора, в 1993 р. його обрали членом-кореспондентом Української академії аграрних наук.

Професор В. Г. Михайлов в ННЦ "Інститут землеробства УААН" керує відділенням селекції і насінництва, у складі якого налічується 8 селекційних відділів і лабораторій та лабораторія селекції Київської дослідної станції. За його безпосереднього керівництва і участі виконуються експериментальні і теоретичні дослідження, в результаті яких по багатьох культурах, з якими проводиться селекційна робота в Інституті, удосконалено методи селекції та насінництва, що забезпечили підвищення результативності робіт із створення і впровадження у виробництво високопродуктивних сортів і гібридів.

У кандидатській (1966 р.) і докторській (1987 р.) дисертаціях В'ячеслава Григоровича, а також наукових праць, надрукованих у 1965–2006 рр., висвітлено експериментальні та теоретичні дослідження з розробки та удосконалення наукових основ селекції, а також зі створення і впровадження у виробництво високопродуктивних скоростиглих сортів сої.

У процесі багаторічних досліджень професор В. Г. Михайлов виявив закономірності успадкування найважливіших якісних і кількісних ознак сої. Ним виявлено низку генетичних факторів, які контролюють тривалість періоду вегетації сої, висоту і тип її росту, осипання насіння, твердонасінність, колір оболонки насіння і рубчика, стерильність пилку, ефективність утворення бульбочок на коренях; виявлені ознаки, які корелюють з продуктивністю, встановлено частку генетичного чинника у загальній мінливості кількісних ознак та інші закономірності генетики сої. На основі вивчення генетики якісних і кількісних ознак виділені донори і джерела скоростиглості, високої насінневої продуктивності, стійкості до найпоширеніших хвороб і інших господарсько-цінних ознак, які використовуються в селекційному процесі; в розробці, апробації і використанні схеми селекції скоростиглих сортів з використання зворотних схрещувань, які дозволяють ввести в генотип скоростиглого сорту гени продуктивності і тим самим створити високопродуктивні сорти при порівняно невеликій кількості селекційного матеріалу. Особливо докладно ці питання висвітлено в роботах останніх 20 років, у тому числі в док-

торській дисертації, а також у виданих у співавторстві монографіях "Селекція, семеноведение и семеноводство сои" (видавництво "Урожай", Київ, 1985) і "Генетика, селекция и семеноводство сои" (видавництво "Наукова думка", Київ, 1987).

Внаслідок виявлених раніше невідомих або недостатньо вивчених генетичних закономірностей окремих ознак професор В. Г. Михайлов науково обґрунтував модель сорту, розробив селекційні програми, а також принципи добору батьківських форм для гібридизації. В результаті створено вихідний матеріал, на основі якого разом з співробітниками відділу селекції і насінництва сої ННЦ "Інститут землеробства УААН", а також дослідних станцій Київського селекцентру й інших установ виведено 28 сортів, які в різні роки були і є внесеними до Реєстру сортів рослин України й інших держав. Це такі сорти, як Київська 48, Зарніца, Іскра, Нива, Веселка, Волна, Жемчужна, Київська 27, Київська 91, Соєр-1 (Ласточка), Чорнобура, Іванка, Чернятка, Мар'яна, Київська 98, Устя, Елена та інші. Ці сорти дозволили значно підвищити ефективність вирощування сої в традиційних зонах і розширити ареал на північні й західні області України, тобто в ті райони, де раніше в зв'язку з пізньостиглістю сою не вирощували, а також створити сорти для поукісних та поживних посівів. Ряд з перелічених вище сортів внесено до реєстру сортів у Молдові, Російській Федерації, зокрема у Волгоградській області і Краснодарському краї, Республіці Білорусь, а також у Великобританії.

Протягом того часу, як під керівництвом і за безпосередньої участі професора В. Г. Михайлова створювались нові

сортів сої і удосконалювалась технологія вирощування, підвищувався і потенціал їх насінневої продуктивності. В результаті створено вихідний матеріал, на основі якого разом із співробітниками лабораторії селекції і насінництва сої ННЦ "Інститут землеробства УААН", а також інших установ виведено 28 сортів, які в різні роки були і є внесеними до Реєстру сортів рослин України і інших держав колишнього СРСР та Великобританії. Перший створений на початку 70-х років минулого століття сорт Київська 48 давав урожай насіння в конкурсному сортовипробуванні 1,8 т/га. Сорти Іскра, Нива, Зарніца у 80-ті роки забезпечували врожаї насіння 2,0–2,3 т/га. Суттєве підвищення врожаю отримано від сорту Київська 27, внесеного до Реєстру в 1990 році, — до 2,8 т/га за тривалості періоду вегетації 120–123 дні. Нові сорти сої Устя, Київська 98 та Єлена, найбільше поширені тепер у виробництві, забезпечують врожаї насіння у виробничих умовах 2,6–3,0 т/га за тривалості періоду вегетації 110–113 днів. Найявні в конкурсному сортовипробуванні нові селекційні номери забезпечили врожаї насіння 3,2–3,4 т/га за тривалості періоду вегетації 95–100 днів. Насінництво нових сортів організовано в ННЦ "Інститут землеробства УААН" і насінневих господарствах України.

Значна робота проводиться В'ячеславом Григоровичем з міжнародного

співробітництва. Завдяки співпраці з міжнародною консалтинговою компанією "Lyle Morrison & Partners" організовано випробування нових, створених в Інституті, сортів сої у Великобританії. В Університеті м. Кембридж успішно пройшли випробування нові сорти Київська 27, Київська 98 і Устя. Ці сорти витримали конкуренцію з низкою кращих сортів США, Канади та інших країн і внесені до реєстру в цій країні та ЄС. Тепер професор В. Г. Михайлов разом із згаданою вище компанією організовує насінництво цих сортів сої у Великобританії та інших країнах ЄС.

В'ячеслав Григорович бере активну участь у підготовці наукових кадрів: читає курси лекцій у Національному аграрному університеті, підготував двох докторів та 10 кандидатів наук. Він є членом спеціалізованої вченої ради із захисту докторських і кандидатських дисертацій при ННЦ "Інститут землеробства УААН".

Бажаємо В'ячеславу Григоровичу Михайлову міцного здоров'я, щасливого творчого довголіття, подальших наукових звершень та наснаги.

*Президія Українського товариства
генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова
Редакційна колегія журналу
"Вісник Українського товариства
генетиків і селекціонерів"*

ОЛЕНА СЕМЕНІВНА АЛЕКСЕЄВА (1926–2006)

16 вересня 2006 р. на 81-му році життя після тривалої хвороби пішла за вічну межу видатний український вчений-селекціонер, доктор сільськогосподарських наук, професор, академік АН ВШ України, член кількох Міжнародних академій, член Президії Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова Олена Семенівна Алексеєва.



Народилася Олена Семенівна 25 квітня 1926 р. в м. ім. Шварця Широківського району Дніпропетровської області. Свій науковий шлях розпочала у 1950 році після закінчення Київського сільськогосподарського інституту. У 1950–1956 рр. працювала науковим співробітником, завідувачем відділу селекції, заступником директора з наукової роботи Тернопільської селекційно-дослідної станції, у 1956–1971 рр. — старшим науковим співробітником відділу селекції і насінництва Науково-дослідного інституту землеробства і тваринництва західного регіону України. З 1971 р. до останніх днів життя завідувала кафедрою селекції, насінництва і генетики сільськогосподарських культур Подільського державного аграрно-технічного університету, була професором кафедри, директором науково-дослідного Інституту круп'яних культур. Вона — ініціатор створення і науковий керівник Тернопільської виробничо-наукової системи "Гречка". З 1987 року була членом правління Міжнародної асоціації виробників гречки.

Професор О. С. Алексеєва була головою Міжвузівської координаційної ради з круп'яних культур, заступником голови Міжвузівської ради з сільськогосподарської радіобіології, членом координаційних та методичних рад з селекції і технології вирощування сільськогосподарських культур при Агропромі СРСР, членом Ради з сільськогосподарської радіобіології при Президії ВАСГНІЛ та членом методичної комісії з селекції гречки при відділі рослинництва ВАСГНІЛ.

Олена Семенівна виконала теоретичні і методичні розробки з селекції гречки, запропонувала нові методи створення вихідного матеріалу в селекції (на базі цих розробок створені сорти Вікторія і Галея);

вперше розробила і застосувала в селекції гречки метод експериментального мутагенезу (цим методом створені сорти Аеліта, Лада, Галея, Степова), метод сумісної дії радіації і хімічних мутагенів, який дав можливість створити крупноплідні форми і сорти гречки (Подольяна, Кара-Даг, Яна); встановила специфічність дії різних мутагенних чинників на мутаційний процес у гречки, а також особливості стабілізації мутантів старших поколінь (до М40). Одержала зеленоквіткову форму гречки, яка стала донором стійкості плодів до осипання. На її основі створено чотири сорти, зокрема: Зеленоквітова 90, Зеленоквітова 93, Роксолана, Маліковська. Професор О. С. Алексеева створила унікальну колекцію мутантів гречки з широким спектром мінливості внаслідок обробки різними мутагенами, а також колекцію світового генофонду гречки в Україні.

Титанічна працездатність та вироблена багаторічним досвідом інтуїція дали змогу професору О. С. Алексеевій створити протягом понад 55 років творчої праці 34 сорти гречки, значна частина яких висівається на мільйонах гектарів України та інших країн. Вона є автором 24-х монографій та навчальних посібників, понад 350 наукових праць. Під її керівництвом виконано і

захищено понад 40 докторських і кандидатських дисертацій. Серед її учнів — члени Української академії аграрних наук, професори, доценти. Вона створила наукову школу "Fagopyrum". Була одним із фундаторів Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова, з 1967 р. на кожному із його з'їздів її обирали членом Президії товариства.

За наукові і трудові заслуги, багаторічну плідну громадську і педагогічну діяльність професор О. С. Алексеева нагороджена орденом Трудового Червоного Прапора, медаллю ім. М. В. Ломоносова, багатьма медалями СРСР, орденом Ярослава Мудрого, іншими відзнаками.

Світла пам'ять про Олену Семенівну Алексееву — невтомного вченого-селекціонера, талановитого організатора науки, педагога, скромну, чуйну, глибоко порядну, високошановану та інтелігентну людину — назавжди збережеться у наших серцях, у серцях її колег та учнів.

*Президія Українського товариства
генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова
Редакційна колегія журналу
"Вісник Українського товариства
генетиків і селекціонерів"*

III МІЖНАРОДНА КОНФЕРЕНЦІЯ “ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ”

В. А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

25–28 вересня 2006 року в м. Алушта (Автономна Республіка Крим) відбулася III Міжнародна конференція “Фактори експериментальної еволюції організмів”, присвячена 100-річчю від дня народження видатних українських генетиків С. М. Гершензона та П. К. Шкварнікова. (Перша і друга конференції відбулися там само восени 2003 та 2004 року відповідно). Третя конференція, як і дві перші, організована Українським товариством генетиків і селекціонерів імені М. І. Вавилова за сприяння і підтримки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та Інституту цукрових буряків УААН.

До початку конференції за її матеріалами було опубліковано книгу “Фактори експериментальної еволюції організмів”, збірник наукових праць, т. 3, Київ, Логос, 2006, 684 с. (Матеріали попередніх конференцій вийшли друком раніше: “Фактори експериментальної еволюції організмів”, Київ, Аграрна наука, 2003, 464 с.; “Фактори експериментальної еволюції організмів”, т. 2, Київ, Аграрна наука, 2004, 416 с.)

У роботі конференції, яка проходила в туристично-оздоровчому комплексі “Чайка”, взяли участь провідні біологи, аграрії, медики, а також молоді вчені, аспіранти з України, Росії та Білорусі. Було надіслано матеріали для участі також з Чеської республіки, Великобританії та Швеції. Всього було зареєстровано 94 учасники, які представляли організації провідних наукових центрів Києва, Москви, Мінська, Лондона, Відня, Оломоуца (Чехія), Автономної Республіки Крим, Новосибірська, Уфи, Харкова, Львова, Луганська, Одеси, Херсона, Донецька, Луцька, Івано-Франківська та ін.

Відкрив конференцію привітанням та вступним словом президент УТГіС ім. М. І. Вавилова, академік УААН **М. В. Роїк**. Доповідь “На передових рубежах генетики (до 100-річчя від дня народження С. М. Гершензона)” зробив член-кореспондент НАН України **С. С. Малиута**, після якої

учасники конференції з великим інтересом переглянули науково-популярний кінофільм "Спростування центральної догми" про найвидатніші наукові досягнення академіка НАН України С. М. Гершензона. Член-кореспондент НАН України **В. А. Кунах** у своїй доповіді розповів про життєвий шлях, наукові здобутки, науково-організаційну діяльність, громадську позицію першого президента УТГІС ім. М. І. Вавилова, доктора біологічних наук, професора П. К. Шкварнікова у зв'язку зі сторіччям від дня його народження.

На пленарному засіданні 26 вересня 2006 р. було заслухано і обговорено 4 доповіді з найактуальніших напрямів сучасної генетики і біотехнології. Доктор медичних наук, професор **І. Р. Барилляк** (Науковий центр радіаційної медицини АМН України, м. Київ) зробив доповідь "Вроджені вади розвитку – вплив Чорнобильської катастрофи". На конкретних фактах широкомасштабних досліджень він продемонстрував, що достовірної різниці у частоті народжень дітей з вродженими вадами розвитку у жінок, які проживали на постраждалих від аварії та "чистих територіях", наразі немає. Для рідкісних видів вроджених вад розвитку, що трапляються в популяції в нормі з частотою 10^{-5} і менше, на забруднених територіях встановлено тенденцію до зростання їх частоти. Ця доповідь привернула особливу увагу слухачів, викликала зливу запитань і широке обговорення стану генетичних досліджень спадкових захворювань людини, вроджених вад розвитку та пошуку шляхів їх профілактики.

Від імені колективу авторів, які представляли Інститут біології розвит-

ку ім. Н. К. Кольцова Російської академії наук, м. Москва, та Московський НДІ очних хвороб ім. Гельмгольца МОЗ РФ, доповідь "Моделі органотипічного культивування тканин ока *in vitro* для тестування регуляторних молекул" зробив доктор біологічних наук **М. С. Краснов**. Використовуючи різні способи культивування різних тканин ока *in vitro*, автори встановили, що за умови збереження просторової структури і організації ока існує консервативний механізм їх репарації незалежно від причини пошкодження. Цей механізм запускається за допомогою регуляторних пептидів, які є активними у надмалих дозах і продукуються відповідними тканинами. У хребетних ці регуляторні пептиди мають тканинну специфічність та не мають видової специфічності дії. Автори продемонстрували можливість лікування тяжких очних хвороб за допомогою регуляторних пептидів.

Доктор біологічних наук, професор **М. В. Кучук** (Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, м. Київ) у своїй доповіді "Трансгенний, транспластомний та транз'єнтний підходи для експресії чужинних генів у рослинах" представив результати роботи відділу генетичної інженерії ІКБП НАН України зі створення трансгенних рослин та вивчення експресії перенесених генів з використанням нових методів генетичної трансформації, зокрема у таких видів, як цукровий буряк, ріпак, квасоля та інші. Також автор доповів новітні результати з трансформації хлоропластної ДНК рослин та можливості тимчасової (транз'єнтної) експресії генів у рослинах, що дає можливість за короткий час накопичувати значні кількості рекомбінантних білків, у тому числі білків людини та тварин.

У доповіді доктора біологічних наук, професора **С. І. Малецького** (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ, Росія) "Ротаційна мінливість репродуктивних ознак у рослинних популяціях" було зроблено загальну класифікацію ознак у рослин та виділено ознаки, які позначено терміном "суперознаки". До категорії суперознак доповідач відносить репродуктивні ознаки рослин, а їх мінливість у популяціях позначає терміном "ротаційна мінливість". Було наведено докази того, що суперознаки підлягають епігенетичній мінливості та успадковуються як прості менделівські ознаки.

27–28 вересня проходили засідання чотирьох секцій: еволюція та молекулярна організація геномів у природі та експерименті; аналіз, оцінка генетичних ресурсів та експериментальний мутагенез; біотехнології у медицині та сільському господарстві; механізми взаємодії та експресії генетичних систем та питання викладання генетики, еволюції та біотехнології. На секціях особливу увагу та зацікавленість і, подекуди, бурхливу дискусію викликали доповіді: кандидата біологічних наук **С. С. Юданової** (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ, Росія) "Міксоплоїдія клітинних популяцій та проблема стовбурових клітин у рослин"; члена-кореспондента УААН **В. А. Кравченка** (Науково-дослідний і навчальний центр закритого ґрунту, м. Київ) "Генетичні ресурси овочевих культур при селекції в закритому ґрунті"; доповідь, виголошена кандидатом біологічних наук **О. Г. Алхімовою** від великого міжнародного колективу (Інститут молеку-

лярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна; Інститут експериментальної ботаніки Чеської академії наук, м. Оломоуц, Чеська республіка; Інститут цитології і генетики Сибірського відділення РАН, м. Новосибірськ, Росія) "Характеристика повторів ДНК термінальних районів хромосом жита: 1R хромосома"; кандидата біологічних наук **Н. Е. Кожухової** (Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН та МОН України, м. Одеса) "Молекулярні маркери у генетиці, селекції та насінництві кукурудзи"; доктора сільськогосподарських наук **Ю. О. Лавриненка** (Інститут землеробства південного регіону УААН, м. Херсон) "Селекційно-генетичні ресурси пшениць Афганістану"; доктора біологічних наук, професора **І. Д. Соколова** із співавторами (Луганський аграрний університет) "Морфологічна генотипова мінливість *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuph. у зв'язку з типологічною концепцією виду"; кандидата біологічних наук **І. А. Козерецької** та **О. В. Проценко** (Київський національний університет ім. Тараса Шевченка) "Мутаційні процеси в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України"; аспірантки **А. С. Драніциної** із співавторами (Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ) "Поліморфізм ДНК особин пінгвінів Дженту (*Pinguicula vulgaris*) та пінгвінів Аделі (*P. adeliae*) за молекулярно-біологічними маркерами"; кандидата біологічних наук **Л. Т. Манило** від колективу авторів (Інститут колоїдної хімії та хімії води НАН України; Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; Зоологічний музей

НАН України, м. Київ) "Порівняльна характеристика формули крові антарктичних риб"; доктора біологічних наук **Л. О. Лісневич** та **О. М. Радченко** (Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, м. Київ) "Ідентифікація за білковими та ДНК-маркерами сортів озимої м'якої пшениці, створених в Інституті фізіології рослин та генетики НАН України"; молодшого наукового співробітника **Я. Ю. Шарипіної** із співавторами (Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва УААН, м. Харків) "Успадкування деяких морфологічних ознак соняшника"; кандидата сільськогосподарських наук **В. Г. Вировець** із співавторами (Інститут луб'яних культур УААН, м. Глухів, Україна) "Однодомні посівні коноплі (*Cannabis sativa* L.) як приклад реверсійної еволюції культури"; кандидата біологічних наук **Е. І. Сич** (Луганський національний аграрний університет, Україна) "Взаємодія картованих генів арабідопсиса Таля за ознакою "маса рослин"; кандидата біологічних наук **Г. М. Семчишин** (Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника, м. Івано-Франківськ, Україна) "OxyR та soxRS регулони захищають *Echerichia coli* від H₂O₂-індукованого стресу" та ін.

З великою увагою і подальшим широким обговоренням сучасного стану біотехнології та перспектив її розвитку, тенденцій у практичному використанні біотехнологічних досліджень було заслухано доповіді кандидата біологічних наук **О. В. Білинської** (Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва УААН, м. Харків) "Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах

низької позитивної температури"; кандидата біологічних наук **Н. А. Єгорова** та кандидата сільськогосподарських наук **І. В. Ставцевої** (Інститут ефіроолійних і лікарських рослин УААН, м. Сімферополь) "Експериментальні підходи у клітинній селекції на стійкість до абіотичних стресів у ефіроолійних рослин"; кандидата біологічних наук **І. В. Максимова** із співавторами (Інститут біохімії і генетики Уфимського наукового центру РАН, м. Уфа, Росія) "Використання сумісних культур калюсів пшениці з фітопатогенними грибами для скринінгу засобів захисту рослин із імуностимулюючими властивостями"; аспіранта **В. С. Гришкової** від великого колективу авторів (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ; Лондонський університет, Великобританія) "Отримання моноклональних антитіл проти котраспортера фосфатів NapIIIb"; доктора біологічних наук **Т. М. Чеченєвої** (Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, м. Київ) "Екобіотехнологія злаків"; кандидата біологічних наук **О. В. Кириченко** (Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, м. Київ) "Практичне використання лектинів сої та пшениці у рослинництві"; кандидата біологічних наук **І. В. Мітрофанової** (Нікітський ботанічний сад, м. Ялта) "Використання біотехнологічних методів у селекції та оздоровленні кісточкових плодкових і субтропічних культур"; наукового співробітника **Н. Н. Іванової** із співробітниками (Нікітський ботанічний сад, м. Ялта) "Клональне мікророзмноження півонії деревовидної"; наукових співробітників **Т. Д. Мовчан** та **Д. С. Тимчука** (Інститут рослин-

ництва ім. В. Я. Юр'єва УААН, м. Харків; Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна) "Мінливість вуглеводного складу зерна ліній та гібридів цукрової кукурудзи на основі різних ендоспермальних мутацій" та ін.

У цілому, на конференції із 101 заявленої доповіді було заслухано та обговорено 6 пленарних доповідей, 32 доповіді на засіданнях секцій та 51 стендове повідомлення.

На заключному засіданні було проведено загальну дискусію, на якій підбито підсумки стану та перспектив розвитку сучасних напрямків генетики, селекції, еволюції та біотехнології. Відмічено іс-

тотне відставання країн СНД у цих галузях від рівня світових досліджень. З метою більш тісного спілкування, обміну науковими результатами та досвідом учасники конференції звернулись до Президії УТГіС ім. М. І. Вавилова з проханням і надалі проводити наукові конференції з актуальних напрямів сучасної генетики, селекції, біотехнології, питань експериментальної еволюції тощо; запрошувати до участі ширше коло фахівців у цих галузях з інших країн; розглянути можливість стимулювання участі в роботі конференцій молодих науковців, особливо з периферійних наукових та навчальних закладів.

© УКРАЇНСЬКЕ ТОВАРИСТВО ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ, 2006

Комп'ютерна верстка
І. Г. Васинюк
Коректор
О. А. Дітель
Технічний редактор
М. С. Чабан

Підписано до друку 15.02.2007. Формат 70 x 100 1/16.
Папір офс. № 1. Гарнітура "Прагматика". Друк офс.
Ум. друк. арк. 13,5. Обл.-вид. арк. 14,2.
Наклад 300 прим. Зам. 98.

Видавництво "ЛОГОС"
Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-60-03

ВІСНИК

УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ

ISSN 1810-7834, ВІСН. УКР. ТОВ-ВА ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ, Том 4 · 2 · 2008

