

исследования аллельного полиморфизма и определения частот встречаемости аллелей минисателлитного локуса D1S80 для жителей Беларуси были генотипированы образцы ДНК неродственных индивидуумов, представляющих собой три группы.

Первая группа состояла из случайно отобранных неродственных этнических белорусов из 9 популяций, проживающих в различных историко-этнографических зонах Беларуси: Полоцк, Пинск, Молодечно, Мядель, Крупки, Сморгонь, Иваново, Городок, Климовичи.

Вторая группа сформирована из одновременно отобранных неродственных индивидуумов, постоянно проживающих в этих же регионах и представляющих другие этносы или происходящих от смешанных браков.

Третья группа, обозначенная как “семейные” данные, сформирована из образцов буккального эпителия неродственных индивидуумов (предполагаемых отцов и матерей), прошедших тест по установлению отцовства в лаборатории МБИ НИИ ПК и СЭ.

Всего в белорусских популяциях идентифицировано 28 аллелей. Во всех исследованных популяциях отмечается максимальная частота встречаемости аллелей “18” и “24” с доминированием аллеля “24” (0,36-0,37), при этом суммарная частота аллелей “18” и “24” составляет от 0,57 до 0,69 в зависимости от популяции. Доля аллелей, лежащих последовательно в диапазоне от аллеля “18” до аллеля “31”, в разных популяциях существенно не отличается и составляет от 0,94 до 0,97. Таким образом, суммарная частота встречаемости редких аллелей, лежащих в диапазоне от “15” до “17” аллеля и аллелей больше “31” составляет от 0,025 до 0,059. Не выявлены в популяциях этнических белорусов аллели: “14”, “39” и “43”.

Полученные значения параметров информативности локуса D1S80 свидетельствуют о высокой дифференцирующей способности локуса и позволяет использовать этот минисателлитный локус для целей судебно-криминалистической идентификации.

Методами популяционно-генетической статистики выяснено, что гетерогенность популяции белорусов по локусу D1S80 варьирует от 0,668 до 0,774, что означает отсутствие выраженных отличий в распределении аллелей в различных регионах Беларуси и позволяет формировать единую референтную базу данных частот встречаемости аллелей для всей территории Беларуси с целью адекватной оценки уровня достоверности экспертных выводов при идентификации личности методом ДНК-анализа при работе с аутосомными локусами.

В результате работы была сформирована VNTR- база данных белорусов из 1286 индивидуальных образцов. Полученные значения частот встречаемости аллелей могут быть рекомендованы для использования экспертно-криминалистическими учреждениями страны при расчете достоверности результатов молекулярно-генетических исследований.

1. *Y. Nakamura* Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT118) on chromosome 1p [D1S80] // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16, № 19. – P. 9364.
2. *D. Tautz* Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers // *Nucleic Acid Res.* – 1989. – V. 17, № 16. – P. 6463-6471.
3. *K. Fujii, K. Sekiguchi, K. Shimizu, K. Kasai* A new sequenced allelic ladder marker for D1S80 typing // *J. Hum. Genet.* – 2004. – V. 49. – P. 169-171.

## **ВЛИЯНИЕ “БАЙСТЭНДЕР” ФАКТОРОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

**П.М. Морозик, И.Б. Моссэ**

*ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь*

*P.Marozik@igc.bas-net.by*

“Байстэндер” эффект (bystander effect) - это явление, которое описывает способность клеток, пораженных каким-либо агентом, передавать повреждающие факторы другим

клеткам, находящимся в контакте или нет, на которые прямо этим агентом не воздействовали [1]. В настоящем исследовании в качестве такого агента выступало ионизирующее  $\gamma$ -облучение, хотя также «байстэндер» эффект может быть индуцирован и  $\alpha$ -,  $\beta$ -, лазерным излучением и др.

Впервые радиационно-индуцированный «байстэндер» эффект (РИБЭ) был показан в 1954 г., когда при радиотерапии лейкемии у детей в результате облучения селезенки наблюдали поражение костного мозга [2].

Серьезно изучать РИБЭ начали лишь после 1992 года, когда было доказано его существование при  $\alpha$ -облучении клеток китайского хомячка. Было показано, что при облучении 0,1-1% клеток, в культуре наблюдалось повышение частоты обменов между сестринскими хроматидами в 30% клеток [3]. С тех пор было получено много информации о РИБЭ, но его механизм и природа индуцирующих его факторов не известны до сих пор.

Особый интерес представляет изучение РИБЭ *in vivo*. В настоящем исследовании было проведено изучение эффектов «байстэндер» факторов, индуцированных *in vivo* в организме человека в результате радиационного облучения на жизнеспособность культуры клеток кератиноцитов человека, иммортализованных вирусом папилломы человека (HPV-G клетки). Вследствие иммортализации клетки являются мутантными по p53 и растут в культуре с формированием монослоя, при этом отсутствуют межклеточные контакты.

HPV-G клетки культивировали в среде Дульбекко DMEM: F12 (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% пенициллина-стрептомицина, 1% L-глутамина и 1  $\mu$ г/мл гидрокортизона. Клетки инкубировали в термостате при 37°C в условиях 95% влажности и 5% содержания двуокси углерода и пересевали каждые 8-10 дней.

На HPV-G клетки воздействовали «байстэндер» факторами из сывороток крови облученных в результате аварии на ЧАЭС лиц – ликвидаторов, жителей загрязненных территорий Гомельской области.

Жизнеспособность клеток определяли с помощью метода «Аламар блю» (голубой Аламар) – это безопасный, стабильный в клеточной культуре, нетоксичный водорастворимый краситель, используемый для оценки клеточной жизнедеятельности (метаболической активности) и пролиферации. HPV-G клетки были посеяны в 2 мл среды в 96-ячеечных планшетах (NUNC, США), куда после инкубации вносили сыворотки крови (в некоторых случаях – вместе с радиопротектором). Затем планшеты вновь инкубировали, вносили раствор аламара голубого и через 3 часа анализировали планшеты с помощью спектрофлуориметра (TECAN GENios, Austria) при длине волны возбуждения 540 нм и эмиссии – 595 нм.

Полученные результаты представлены в виде числа флуоресцентных единиц (ФЕ)  $\pm$  стандартная ошибка. Считали среднее число ФЕ трех повторов одного эксперимента и из них вычитали значение ФЕ красителя без клеток. Результаты, полученные при анализе основной группы, сравнивали с интактными клетками ( $K_1$ ) и данными, полученными при воздействии сывороток здорового населения ( $K_2$ ), соответствующих основной группе по возрасту и полу.

На рисунке представлены средние значения данных, полученных методом «Аламар блю» по анализируемым группам (контрольные значения приняты за 100%).

Как видно из результатов, представленных на рисунке, метаболическая активность клеток, на которые воздействовали сывороткой крови необлученных лиц ( $K_2$ ), очень близка к уровню интактных клеток  $K_1$  ( $t=0,33$ ;  $p<0,01$  – разница не достоверна). Это означает, что сыворотка крови необлученных лиц не влияет на метаболическую активность клеток и не содержит «байстэндер» факторов.

Воздействие на клетки сывороткой крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС способствует снижению метаболической активности HPV-G клеток более чем в 1,5 раза – с  $24,89 \pm 0,25 \times 10^3$  ФЕ (интактный контроль) и  $24,67 \pm 0,62 \times 10^3$  (необлученные лица) до

$15,65 \pm 0,82 \times 10^3$  (ликвидаторы),  $p < 0,01$  во всех случаях ( $t=10,79$  и  $8,77$ , соответственно). Воздействие на HPV-G клетки сыворотками жителей загрязненных территорий также способствует снижению активности клеток ( $19,16 \pm 0,71 \times 10^3$ ,  $t=7,62$  по сравнению с интактными клетками,  $p < 0,01$ ), но не так существенно, как сыворотки ликвидаторов.

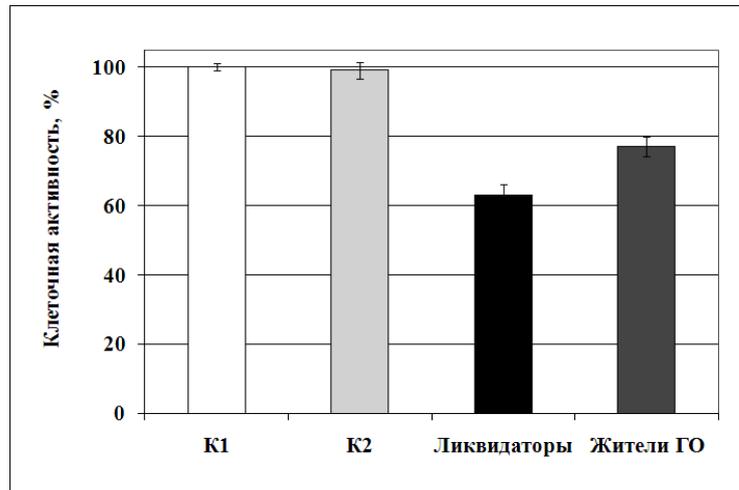
Эти данные подтверждают наши предыдущие исследования с помощью микроядерного и цитогенетического тестов [4], в которых было показано, что “байстэндер” факторы накапливаются в сыворотке крови ликвидаторов и жителей загрязненных территорий.

В наших предыдущих исследованиях *in vitro* [5] было показано, что РИБЭ может быть снижен радиопротекторами с антирадикальными свойствами. В данной работе также была изучена возможность снижения повреждающего эффекта “байстэндер” факторов с помощью радиопротекторов меланина и мелатонина.

Результаты показали, что введение меланина и мелатонина в культуральную клеточную среду вместе с сыворотками крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС не обладает каким-либо защитным эффектом. Метаболическая активность клеток, на которые воздействовали только сыворотками крови ( $16,24 \pm 0,73 \times 10^3$  ФЕ) практически не отличается от метаболической активности клеток, которым кроме сывороток вводили также меланин ( $15,21 \pm 1,13 \times 10^3$  ФЕ) или мелатонин ( $15,45 \pm 1,04 \times 10^3$  ФЕ) – разница не достоверна ( $t=0,77$  и  $0,62$ , соответственно,  $p > 0,05$  в обоих случаях).

“Байстэндер” факторы из сыворотки крови, индуцированные *in vivo*, циркулировали в кровяном русле в течение 20 лет (у ликвидаторов) или менее (для остальных групп) после облучения. Так как меланин и мелатонин являются натуральными веществами и всегда в норме присутствуют в организме человека, можно предположить, что эти радиопротекторы уже нейтрализовали *in vivo* в кровяном русле все повреждающие факторы.

В целом, представленные данные изучения эффектов сывороток крови на метаболическую активность HPV-G клеток подтверждают данные предыдущих экспериментов о том, что облучение индуцирует повреждающие факторы, сохраняющиеся в клетках после облучения и способные снижать метаболическую активность клеток. При этом группа ликвидаторов является наиболее пострадавшей по сравнению с населением загрязненных территорий Гомельской области, а радиопротекторы не способны нейтрализовать “байстэндер” факторы.



**Рис.** Цитотоксический эффект сывороток крови контрольных групп, ликвидаторов аварии на ЧАЭС и жителей загрязненных территорий Гомельской области на HPV-G клетки (интактный контроль принят за 100%, представлены средние значения).

1. B. Djordjevic Bystander effects: a concept in need of clarification // *Bioessays*. – 2000. – V. 22, № 3. – P. 286-290.
2. W. B. Parsons, C. H. Watkins, G. L. Pease, D. S. Childs Changes in sternal bone marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia // *Cancer*. – 1954. – V. 7. – P. 179-189.
3. H. Nagasawa, J. B. Little Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles // *Cancer Res*. – 1992. – Vol. 52. – P. 6394-6396.
4. P. Marozik, C. Mothersill, C. Seymour, I. Mosse, S. Melnov Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident // *Exp Hematol*. – 2007. – V. 35, № 4. – P. 55-63.
5. P. Marozik, I. Mosse, C. Mothersill, C. Seymour Protection by chemicals against radiation-induced bystander effect // C. Mothersill et al. (eds.) “Multiple Stressors – A Challenge for the Future”. – Springer. – 2007. – P. 247-262.