

ҚАРАҒАНДЫ
УНИВЕРСИТЕТІНІҢ
ХАБАРШЫСЫ
ВЕСТНИК
КАРАГАНДИНСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА

ISSN 0142-0843

**БИОЛОГИЯ. МЕДИЦИНА.
ГЕОГРАФИЯ** сериясы
№ 3(71)/2013
Серия **БИОЛОГИЯ.
МЕДИЦИНА. ГЕОГРАФИЯ**

Шілде–тамыз–қыркүйек
1996 жылдан бастап шығады
Жылына 4 рет шығады

Июль–август–сентябрь
Издается с 1996 года
Выходит 4 раза в год

Собственник РГП

**Карагандинский государственный университет
имени академика Е.А.Букетова**

Бас редакторы — Главный редактор

Е.К.КУБЕЕВ,
академик МАН ВШ, д-р юрид. наук, профессор

Зам. главного редактора Х.Б.Омаров, д-р техн. наук
Ответственный секретарь Г.Ю.Аманбаева, д-р филол. наук

Серияның редакция алқасы — Редакционная коллегия серии

М.А.Мукашева,	редактор д-р биол. наук;
Р.Г.Оганесян,	д-р PhD по биотехнол. (США);
Д.В.Суржиков,	д-р биол. наук (Россия);
Н.Т.Ержанов,	д-р биол. наук;
М.Р.Хантурин,	д-р мед. наук;
М.С.Панин,	д-р биол. наук;
Ш.М.Надиров,	д-р геогр. наук;
И.А.Аманжол,	д-р мед. наук;
А.Е.Конкабаева,	д-р мед. наук;
Г.О.Жузбаева,	ответственный секретарь канд. биол. наук

Адрес редакции: 100028, г. Караганда, ул. Университетская, 28
Тел.: (7212) 77-03-69 (внутр. 1026); факс: (7212) 77-03-84.
E-mail: vestnick_kargu@ksu.kz. Сайт: <http://www.ksu.kz>

Редакторы *Ж.Т.Нұрмұханова*
Редактор *И.Д.Рожнова*
Техн. редактор *В.В.Бутяйкин*

Издательство Карагандинского
государственного университета
им. Е.А.Букетова
100012, г. Караганда,
ул. Гоголя, 38,
тел.: (7212) 51-38-20
e-mail: izd_kargu@mail.ru

Басуға 26.09.2013 ж. қол қойылды.
Пішімі 60×84 1/8.
Офсеттік қағазы.
Көлемі 12,0 б.т.
Таралымы 300 дана.
Бағасы келісім бойынша.
Тапсырыс № 970.

Подписано в печать 26.09.2013 г.
Формат 60×84 1/8.
Бумага офсетная.
Объем 12,0 п.л. Тираж 300 экз.
Цена договорная. Заказ № 970.

Отпечатано в типографии
издательства КарГУ
им. Е.А.Букетова

© Карагандинский государственный университет, 2013

Зарегистрирован Министерством культуры и информации Республики Казахстан.
Регистрационное свидетельство № 13106-Ж от 23.10.2012 г.

МАЗМҰНЫ

Серияның редакторы профессор М.А.Мұқашеваның кіріспе сөзі	4
<i>Бурмистрова А.Л.</i> Челябині мемлекеттік университетінің биология факультетіне — 15 жыл	5

ТІРШІЛІКТАНУ

<i>Мейрамов Ф.Ф., Конерт К.-Д., Қиқымбаева А.А., Уолтерс Г., Мейрамова А.Ф.</i> Оқшаланған ұйқыбез аралшықтарының В-жасушаларының күйін талдаудың гистохимиялық әдістері.....	8
<i>Мұқашева М.А., Айтқұлов А.М., Мәкішева С.</i> Ауыр металдардың әсерінен қауіпті жасөсінділердің көбеюін қоршаған орта факторлары ретінде жаңа тұрғыдан зерттеу.....	15
<i>Атаманюк Н.И., Тряпицына Г.А., Иванов И.А., Коновалов А.В., Пряхин Е.А.</i> «Маяк» ОБ В-17 арнайы өнеркәсіптік су қоймасындағы фитопланктон	18
<i>Зарипова О.Н., Бурмистрова А.Л., Чернова М.С., Сулова Т.А., Тимофеева С.В.</i> HLA II класс жүйесіндегі гендердің дендрограммасында нағайбақтар шағын халқының кейбір әлемдік популяциялармен өзара байланысы....	27
<i>Нохрин Д.Ю.</i> Минералданған су қоймасындағы балықтардың микроэлементтік құрамының түрлілік ерекшеліктері мен өзгергіштік көзі....	32
<i>Уржумов П.В., Блинова Е.А., Аклеев А.В.</i> Созылмалы радиациялық әсерге душар болған адамдардағы OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 және ATM гендердің полиморфизмі... ..	38
<i>Донов П.Н., Блинова Е.А., Аклеев А.В.</i> Созылмалы радиациялық әсерге шалдыққан адамдардың CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 гендерінің полиморфизмі.....	45
<i>Погосян Г.П., Жұмашева К.А., Коновалова А.А.</i> Тиазол мен бензотиазол туындыларының мутагенді белсенділігін анықтау	51
<i>Жолболсынова А.С., Қажымуратова А.Т., Джемалединова И.М., Доцанов Д.Е., Валитов Д.А., Бектемисова А.У.</i> Сұлының өсіп-өнуіне поливинил спирті мен крахмалдан тұратын композицияның әсері	56

МЕДИЦИНА

<i>Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А.</i> Диабеттік өкше синдромымен аурағандардың туа біткен иммунитет торының функциялық күйі	61
---	----

СОДЕРЖАНИЕ

Вводное слово редактора серии профессора М.А.Мукашевой	4
<i>Бурмистрова А.Л.</i> Биологическому факультету Челябинского государственного университета — 15 лет	5

БИОЛОГИЯ

<i>Meiramov G.G., Kohnert K.-D., Kikimbayeva A.A., Wolters G., Meyramova A.G.</i> Staining histochemical technologies for B-cells of isolated pancreatic islets	8
<i>Mukasheva M.A., Aitkulov A.M., Makisheva S.</i> The modern approaches to studying of influence of heavy metals as environment factor on growth of malignant	15
<i>Атаманюк Н.И., Тряпицына Г.А., Иванов И.А., Коновалов А.В., Пряхин Е.А.</i> Фитопланктон специального промышленного водоема В-17 ПО «Маяк»	18
<i>Зарипова О.Н., Бурмистрова А.Л., Чернова М.С., Сулова Т.А., Тимофеева С.В.</i> Взаимосвязь малой народности нагайбаков с некоторыми мировыми популяциями в дендрограмме генов системы HLA II класса	27
<i>Нохрин Д.Ю.</i> Источники изменчивости и видовые особенности микроэлементного состава рыб из минерализованного водоема	32
<i>Уржумов П.В., Блинова Е.А., Аклеев А.В.</i> Полиморфизмы генов OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 и ATM у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию	38
<i>Донов П.Н., Блинова Е.А., Аклеев А.В.</i> Полиморфизм генов CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию	45
<i>Погосян Г.П., Жумашева К.А., Коновалова А.А.</i> Определение мутагенной активности производных тиазола и бензотиазола	51
<i>Жолболсынова А.С., Қажымуратова А.Т., Джемалединова И.М., Доцанов Д.Е., Валитов Д.А., Бектемисова А.У.</i> Влияние композиций из поливинилового спирта и крахмала на рост и развитие овса	56

МЕДИЦИНА

<i>Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А.</i> Функциональное состояние клеток врожденного иммунитета у пациентов с синдромом диабетической стопы .	61
--	----

<i>Андреева С.В., Нохрин Д.Ю., Бахарева Л.И.</i> Күйік жараларынан алынған микроағзалар тұтастығының экологиялық дәрежесін сараптау 66	<i>Андреева С.В., Нохрин Д.Ю., Бахарева Л.И.</i> Оценка степени экологической общности микроорганизмов, выделенных из ожоговых ран..... 66
<i>Беляева С.В., Бурмистрова А.Л., Сташкевич Д.С., Сулова Т.А., Ананьева И.П.</i> Челябині облысындағы орыс популяциясының өкілдеріндегі өкпе туберкулезі аурулардың TNF α (-308 және -238) генінің полиморфизмдер тұқымы 72	<i>Беляева С.В., Бурмистрова А.Л., Сташкевич Д.С., Сулова Т.А., Ананьева И.П.</i> Полиморфизмы гена TNF α (-308 и -238) у больных туберкулезом легких представителей русской популяции Челябинской области..... 72
<i>Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л., Иванова Е.Л.</i> Ісінген ішек синдромы мен негізгі цитокиндерде полиморфтық гендер ассоциацияларын талдау 78	<i>Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л., Иванова Е.Л.</i> Анализ ассоциации полиморфных генов основных цитокинов с синдромом раздраженного кишечника..... 78
<i>Хромова Е.Б., Бурмистрова А.Л., Сулова Т.А., Шилова Т.В., Пицальников А.Ю., Волосников Д.К.</i> Челябині облысының орыс популяциясының ересектерде құяң артриттың дамуымен және балаларында ювенил идиопатия артриттың II класс HLA гендерінің ассоциациясы 84	<i>Хромова Е.Б., Бурмистрова А.Л., Сулова Т.А., Шилова Т.В., Пицальников А.Ю., Волосников Д.К.</i> Ассоциация генов HLA II класса с развитием ревматоидного артрита у взрослых и ювенильного идиопатического артрита у детей русской популяции Челябинской области..... 84
ГЕОГРАФИЯ	
<i>Жомартова Г.Ж.</i> Қазақстан туризмі: даму мәселелері мен келешегі 90	<i>Zhomartova G.Zh.</i> Tourism in the Republic of Kazakhstan: development problems and prospects 90
АВТОРЛАР ТУРАЛЫ МӘЛІМЕТТЕР 95	СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ..... 95

Дорогие читатели!

Президент Казахстана Нурсултан Назарбаев в своем ежегодном Обращении к народу заявил, что одной из главных целей социальной модернизации страны является улучшение качества образования и развитие новой модели учебного заведения. Для этого необходимо проявлять большую заинтересованность в знакомстве с достижениями других научных школ.

В настоящий номер «Вестник Карагандинского университета» вошли статьи ведущих ученых и специалистов биологического факультета Челябинского государственного университета (ЧелГУ). Публикации отражают современное состояние научного потенциала не только ЧелГУ, но и крупных учреждений Челябинска, таких как ФГУ «Уральский научно-практический центр радиационной медицины (УНПЦРМ)», ЧелГМА, НИИ иммунологии ЧелГМА, Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинская областная станция переливания крови, лечебно-профилактические учреждения, учреждения санитарно-гигиенического надзора, предприятия пищевой промышленности, что является ярким примером научного и учебного сотрудничества ведущих организаций Челябинска и позволяет решать фундаментальные и прикладные задачи города, области, региона.

История развития и достижения биологического факультета ЧелГУ включает результаты исследований, имеющих приоритетный характер в медико-биологической науке.

Публикация некоторых научных исследований ведущих специалистов биологического факультета Челябинского государственного университета — результат тесного сотрудничества ученых России и Казахстана.

М.А.Мукашева,
научный редактор серии
д.б.н., профессор

Биологическому факультету Челябинского государственного университета — 15 лет

Биологический факультет Челябинского государственного университета (ЧелГУ) был создан в 1998 г. (приказ от 30 апреля 1998 г. № 231–1).

Создание биологического факультета и все его достижения неразрывно связаны с ЧелГУ и с именами руководителей крупных учреждений Челябинска. Назовем их:

Аклеев Александр Васильевич — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор Уральского научно-практического центра радиационной медицины (УНПЦРМ), заведующий кафедрой радиационной биологии биологического факультета ЧелГУ;

Долгушин Илья Ильич — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, заслуженный деятель науки, ректор Южно-Уральского государственного медицинского университета (ЮУГМУ), директор НИИ иммунологии ЮУГМУ;

Шестопалов Сергей Степанович — доктор медицинских наук, заслуженный врач России, главный врач ГКБ № 6;

Янина Светлана Ивановна — главный врач Челябинской областной станции переливания крови (ЧОСПК);

Брюхин Геннадий Васильевич — доктор медицинских наук, профессор заведующий кафедрой гистологии, цитологии, эмбриологии ЮУГМУ, профессор кафедры микробиологии биологического факультета ЧелГУ;

Ячменев Владислав Анатольевич — кандидат географических наук, доцент начальник Управления отраслевой политики Законодательного собрания Челябинской области, заведующий кафедрой биоэкологии биологического факультета ЧелГУ;

Бурмистрова Александра Леонидовна — доктор медицинских наук, профессор заведующая кафедрой микробиологии, декан биологического факультета ЧелГУ. А.Л.Бурмистрова была приглашена из ЮУГМУ в 1997 г. для организации биологического факультета.

Основные отличительные признаки биологического факультета ЧелГУ

Обучение студентов в условиях производства — одна из важнейших составляющих компетентностно-квалификационных характеристик выпускников, которая отражает экономические и социальные запросы региональных рынков труда и определяет высокую конкурентную способность наших выпускников.

Биологический факультет ЧелГУ является ярким примером научного и учебного сотрудничества ведущих организаций Челябинска: УрО РАН, УНПЦРМ, ЮУГМУ, лечебно-профилактических учреждений и учреждений санитарно-гигиенического надзора, предприятий пищевой промышленности, что позволяет решать фундаментальные и прикладные задачи города, области, региона. Одним из примеров такого сотрудничества является выполнение научно-учебным Центром молекулярной иммуногенетики УрО РАН (ЧелГУ/ЧОСПК) научной программы «Иммуногенетическая характеристика народов Челябинской области» (на территории Челябинской области проживает более 5 этнических групп — русские, татары, башкиры, нагайбаки и др.)



А.Л.Бурмистрова,
доктор медицинских наук, профессор

Высокотехнологические специальности и направления подготовки. На факультете три выпускающие кафедры — микробиологии, радиационной биологии, биоэкологии. Подготовка осуществляется по трем специальностям: «Микробиология» (специализация «Медицинская микробиология»), «Биология» (специализация «Радиационная биология, генетика, цитология и гистология») и «Биоэкология» (специализации «Биологический мониторинг окружающей среды», «Управление природопользованием») и направлениям подготовки: 020400 «Биология», квалификация «Бакалавр». Профили подготовки — микробиология, физиология, генетика, биофизика, биоэкология; 020400 «Биология» квалификация (степень) — «Магистр» (6 магистерских программ).

Руководители магистерских программ:

– Декан биологического факультета, зав. кафедрой микробиологии д.м.н., профессор А.Л.Бурмистрова — программы «Медико-биологические науки», «Микробиология и вирусология».

– Зав. кафедрой радиационной биологии ЧелГУ, директор ФГУ «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» профессор, д.м.н., заслуженный деятель науки РФ А.В.Аклеев — программы «Радиационная биология», «Генетика».

– Профессор кафедры микробиологии ЧелГУ, зав. кафедрой эмбриологии, гистологии и цитологии ЮУГМУ д.м.н. Г.В.Брюхин — программа «Биология развития».

– Зав. кафедрой биоэкологии, начальник отдела отраслевой политики Законодательного собрания Челябинской области к.г.н. В.А.Ячменев — программа «Экология».

На факультете осуществляется подготовка по программам дополнительного образования на базе высшего образования: «Пищевая микробиология», «Биология развития», «Вопросы безопасности работы с ПБА III-IV групп патогенности».

Конкурентоспособность выпускников на рынке труда и сфера их профессиональной деятельности. За 15 лет биологический факультет выпустил 529 специалистов. О качестве подготовленных специалистов свидетельствуют их востребованность и места трудоустройства: 20 % работают в ведущих научно-исследовательских учреждениях России и за рубежом (Москва, Санкт-Петербург, Екатеринбург, Саратов, Томск; США, Германия, Франция); 50 % заняты в области здравоохранения, 30 % — на пищевых и промышленных предприятиях, в органах охраны природы и управления природопользованием.

В настоящее время на бюджетной и договорной основе на факультете обучаются около 520 студентов. Учебные аудитории, лаборатории и экспериментальные базы факультета располагаются не только в ЧелГУ. Факультет, в соответствии с договорами о сотрудничестве, получил возможность обучать студентов на базах УНПЦРМ, ГКБ № 6, ЮУГМУ, Челябинской станции переливания крови и при участии сотрудников этих учреждений.

Вектор научных исследований и их результативность. На биологическом факультете ведутся исследования по направлениям:

1. Иммуногенетическое картирование основных этнических групп населения Челябинской области.
2. Полиморфизм аллельных вариантов генов локусов HLA I и II класса и генов цитокинов у больных мультифакторными и инфекционными заболеваниями (сепсис, туберкулез, ревматоидный артрит, эссенциальная гипертензия).
3. Анализ транслокаций у онкогематологических больных.
4. Антибиотикорезистентность госпитальных штаммов микроорганизмов.
5. Микозы и макроорганизм. (Данное направление было включено в список тем, одобренных Министерством по образованию и науки РФ.)
6. Влияние хронических заболеваний гепатобилиарной системы матери на развитие потомства.
7. Отдаленные медико-биологические эффекты хронического радиационного воздействия.
8. Биологическая индикация и биологическая дозиметрия радиационного воздействия.
9. Медико-биологические эффекты внутриутробного облучения.
10. Генетические последствия действия радиации.
11. Проблемы устойчивости водных экосистем в условиях интенсивного антропогенного воздействия.
12. Оценка токсических свойств химических веществ.
13. Использование электрофизиологических воздействий для обеззараживания семян сельскохозяйственных культур.

Все научные работы факультета выполняются при активном участии студентов. Лучшие научно-исследовательские работы студентов удостоены областных грантов и премий.

За 15 лет на факультете опубликовано 30 монографий, 29 учебников и учебно-методических пособий, 2 из которых имеют гриф Министерства образования РФ, около 450 научных работ и получено 2 патента.

Наука и молодежь. На факультете успешно работает аспирантура по трем специальностям: «Клиническая аллергология и иммунология», «Радиационная биология», «Микробиология». За 15 лет сотрудники и выпускники биологического факультета защитили 3 докторские, 32 кандидатские диссертации. В настоящее время в аспирантуре обучаются или являются соискателями 10 человек.

Об имидже факультета свидетельствуют его широкие научные связи: УрО РАН (создан совместный — УрОРАН / ЧелГУ / ЧОСПК — научно-исследовательский Центр молекулярной иммуногенетики), НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи (Москва), Институт иммунологии (Москва), Всемирная организация здравоохранения, Университет им. Дж. Вашингтона (США), Национальный институт рака (США), Японский фонд по изучению последствий радиационных эффектов и многие другие. Факультет гордится своими преподавателями, сотрудниками и студентами.

А.Л.Бурмистрова,
декан биологического факультета
Челябинского государственного университета

UDC 613.2:612.359:616–036.822

G.G.Meyramov¹, K.-D.Kohnert^{1,2}, A.A.Kikimbaeva³, G.Wolters⁴, A.G.Meyramova^{1,5}

¹*Diabetes Research Centre, Karaganda State University;*

²*Institute of Diabetes «Gerhardt Katsch», Karlsburg, Germany;*

³*Astana Medical University;*

⁴*University of Groningen, the Netherlands;*

⁵*Karaganda State Medical University*

(E-mail: meyradow@mail.ru)

Staining histochemical technologies for B-cells of isolated pancreatic islets

A tissue culture experimental model is best for to study the direct effect of diabetogenic chemicals not possible products of its metabolisation on pancreatic B-cells. Authors are adopted to tissue culture model of isolated pancreatic islets histological and histochemical methods analysis of histostructure of islets and of insulin content in B-cells. The high quality results of analysis of histostructure of islets were obtained using Aldehydefuchsin method and most precise results of estimation of insulin content in B-cells by using of fluorescent Pseudoisocyanine and Immunofluorescent methods.

Key words: B-cells, isolated pancreatic islets, histochemical staining methods

In vivo model of experimental diabetes caused by injection or by oral administration of diabetogenic chemicals is not objective regarding obtained results: very often it is difficult to estimate does morphological changes in pancreas are determined by direct alterative effect of diabetogenic substances or this effect is caused by other metabolites formed in organism as result of metabolisation or transformation of diabetogenic injected chemicals in liver, blood or in gastro-intestinal system. Is not possible to know what concentration of injected diabetogenic substance is delivered to pancreatic islets by blood.

Using of experimental model of isolated by Collagenase pancreatic islets it is possible to investigate direct effect of various concentrations of diabetogenic chemicals on pancreatic islets structure and on state of pancreatic B-cells. It is important advantage of model in vivo which possess to obtain objective data about direct action of investigated substances on pancreatic B-cells. Meanwhile not all histological and histochemical methods widely used for staining of pancreas tissue are adopted to model of isolated pancreatic islets.

Aim of work: to adopt methods of fixation and staining procedures for using of isolated pancreatic islets.

Materials and methods

Animals. Pancreas of 24 rats LEWIS 4–5 days old and 8–10 weeks old human embryos were used. Isolation procedures: dissected pancreas tissue were treated 3 times 3 min each by 2 % solution of Collagenase (Boehringer Mannheim, Germany; FLUKA, Switzerland); rinse 3 times in cold Hanks solution and centrifugation; cultivation 12h at +37° Celsius in medium RPMI 1640 (SERVA, Germany) with bovine serum + 5.5 mM of Glucose, pH 7.32–7.38. Fixation in Bouin 15 min – 1 h and filling in paraffin. Sections 4 mcm were used for staining. After deparaffinisation sections were stained by methods: aldehydefuchsin (basic fuchsin from Avocado Chemical company, USA and MERCK, Germany) [1], immunofluorescent method (antiserum for insulin from Institute of Diabetes «Gerhardt Katsch», Germany), Victoria 4R method (FERAK, Germany, MERCK, Germany) [2], Die thylpseudoisocyanine method (SERVA, Germany) [3] and Haematoxylin and Eosin method. All methods were adopted for isolated pancreatic islets tissue [4–6].

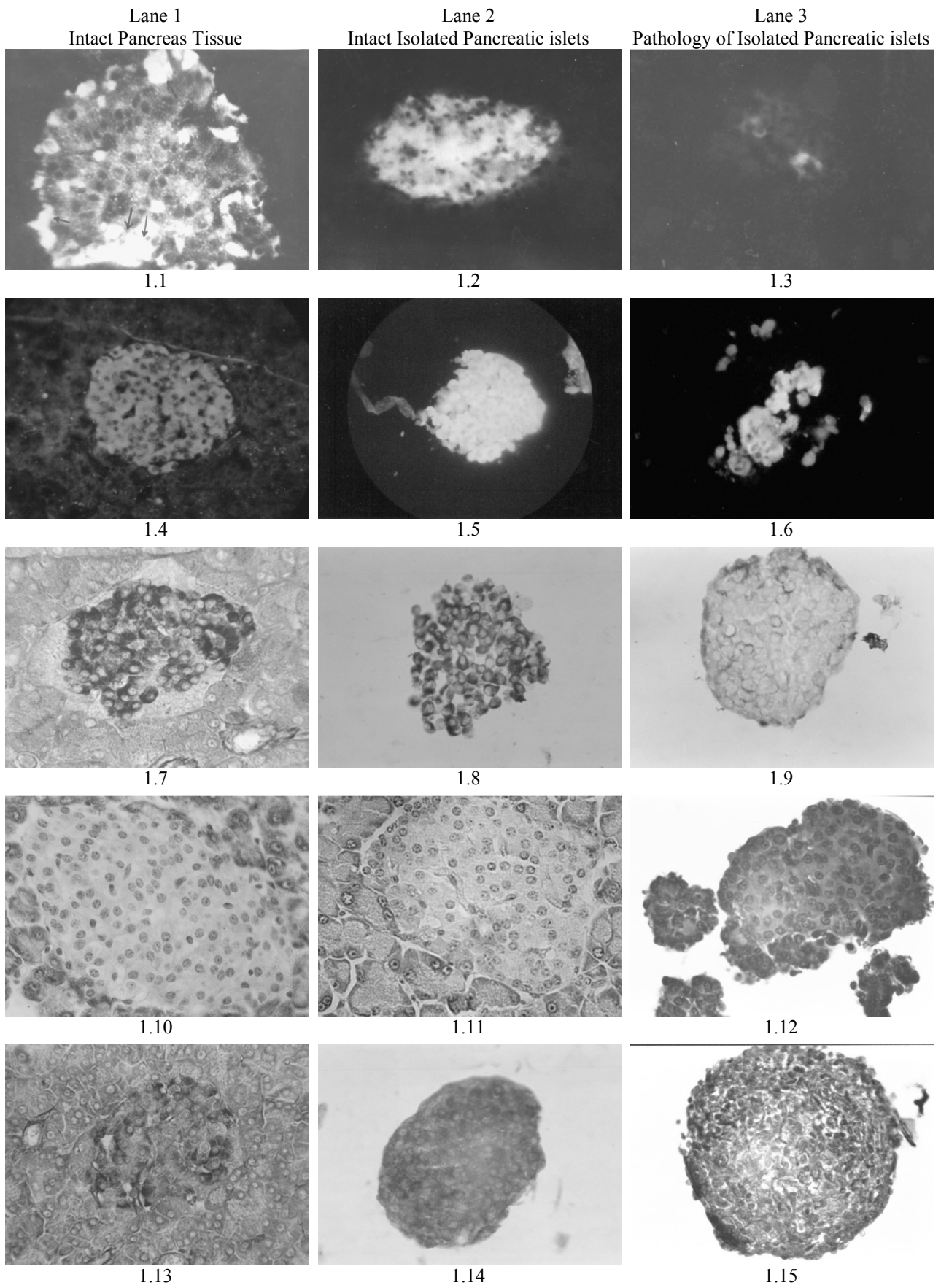


Figure 1. Rat's isolated Pancreatic Islets

- 1.1 Frozed section of fresh islet without staining; $\times 280$;
- 1.2 Positive reaction for Insulin. Immunohistochemical method; $\times 160$;
- 1.3 Negative reaction for Insulin. Immunohistochemical method; $\times 160$;
- 1.4 Positive fluorescent reaction for Insulin in B-cells on Pancreas tissue; Diethylpseudoisocyanine; $\times 140$;
- 1.5 Positive fluorescent reaction for Insulin in B-cells of isolated Islet; Diethylpseudoisocyanine; $\times 140$;
- 1.6 Destruction of isolated Islet and negative fluorescent reaction for Insulin in B-cells; Diethylpseudoisocyanine; $\times 140$;
- 1.7 Positive reaction for Insulin in B-cells on Pancreas tissue; Aldehydefucshine; $\times 280$;
- 1.8 Positive reaction for Insulin in B-cells of isolated Islets; Aldehydefucshine; $\times 280$;
- 1.9 Destruction of isolated Islet and negative reaction for Insulin in B-cells; Aldehydefucshine; $\times 280$;
- 1.10 Islet in Rabbit's Pancreas; Haematoxylin and Eosin; $\times 280$;
- 1.11 Islet in Rat's Pancreas; Haematoxylin and Eosin; $\times 280$;
- 1.12 Isolated Islet of Rat's Pancreas; Haematoxylin and Eosin; $\times 280$;
- 1.13 Islet on Pancreas tissue; Victoria 4R; $\times 280$;
- 1.14 Positive reaction for Insulin in isolated Islet; Victoria 4R; $\times 280$;
- 1.15 Negative reaction for Insulin in isolated Islet; Victoria 4R; $\times 280$;

Histological sections: Prof. G.G.Meyramov, Prof. K.-D.Kohnert — 1.1–1.3.; Prof. A.A.Kikimbaeva — 1.4, 1.7, 1.10, 1.11, 1.13; Prof. G.G.Meyramov, Doz. G.T.Tusupbekova, Doz. A.P.Andreewa — 1.5, 1.6, 1.8, 1.9, 1.11, 1.15, 1.16.

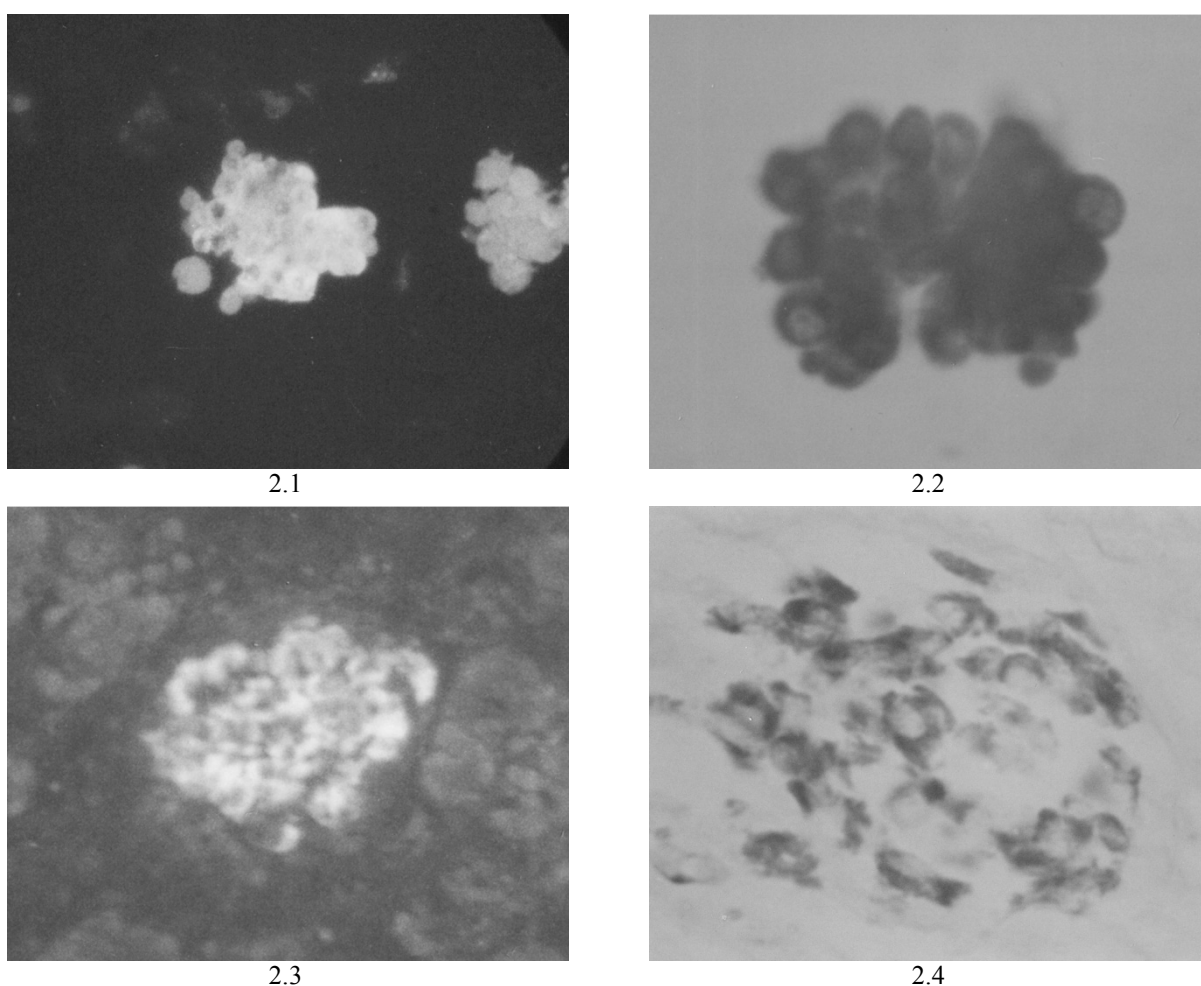


Figure 2. Human embryon's isolated Pancreatic Islets

- 2.1 Pancreatic Islet in study of formation; positive reaction for Insulin; Diethylpseudoisocyanine; $\times 140$;
- 2.2 Pancreatic Islet in study of formation; positive reaction for Insulin; Victoria 4R; $\times 370$;
- 2.3 Pancreatic Islet in study of formation; positive reaction for Insulin; Immunofluorescent method; $\times 140$;
- 2.4 Pancreatic Islet in study of formation; positive reaction for Insulin; Aldehydefuchsin; $\times 140$.

Microphotographs of histological sections:

Histological sections: Prof. G.G.Meyramov, Prof. K.-D.Kohnert — 2.1, 2.3; Prof. G.G.Meyramov, Doz. G.T.Tusupbekova — 2.2, 2.4.

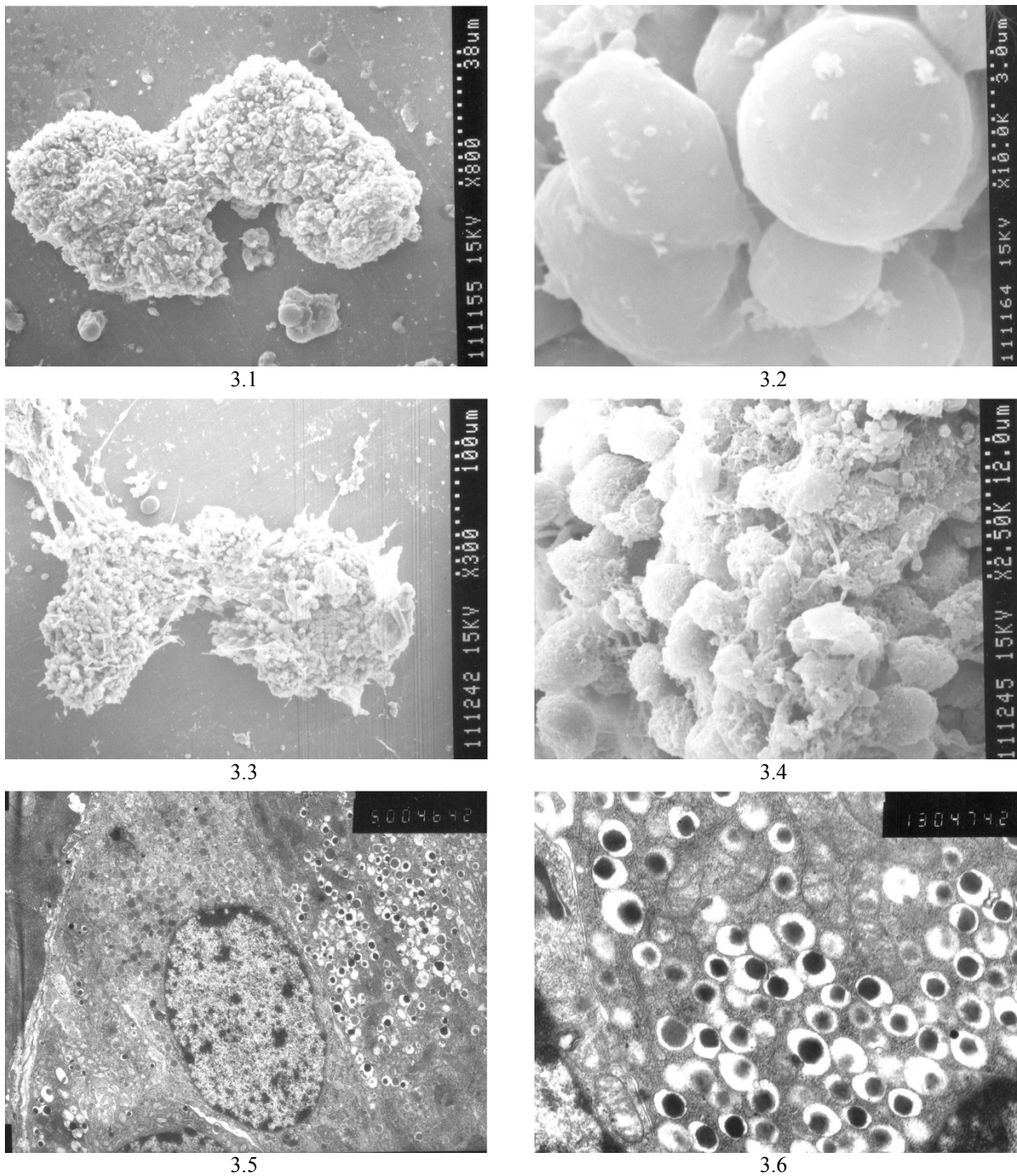


Figure 3. Scanning and Transmission electron microscopy of B-cells of isolated Pancreatic Islets

- 3.1 Isolated intact islet. Scanning electron microscopy; $\times 310$;
- 3.2 Isolated intact islet. Smooth surface of individual A-cells on the surface of islet. Scanning electron microscopy; $\times 1960$;
- 3.3 Isolated islet. Destruction of cells. Scanning electron microscopy; $\times 320$;
- 3.4 Destruction of isolated Islet. Damaged surface of individual A-cells on the surface of Islet. Scanning electron microscopy; $\times 540$;
- 3.5 Isolated intact Islet. Multiple B-granules contained Insulin; cell matrix without changes. Transmission electron microscopy; $\times 3150$;
- 3.6 Multiple B-granules in B-cells of isolated islet; cell matrix without changes. Transmission electron microscopy; $\times 9180$.

Ultra sections: Prof. G.G.Meyramov.

Scanning electron microscopy method. Drying of islets past incubation by CO₂ spraying by gold and were investigated in scanning electron microscope Hitachi S-570 at using voltage 15 kV. Transmission electron microscopy method. Past cultivation in medium RPMI 1640 islets were fixed in 2 % Glutaraldehyde solution 30 min. Filling of Islets in Durcupan. Sections were investigated on JEM-7A electron microscope.

Results

Immunofluorescent staining method [IF]. We have obtained same results of staining by IF as using of sections of pancreas tissue (Fig. 1.1–1.3). IF is high specific method for revealing of Insulin in B-cells. Decreasing of Insulin content in B-cells of islets past action direct action of Streptosotozin was evidently demonstrated by this method (Fig. 1.3).

Diethylpseudoisocyanine chloride fluorescent method [PS], a high specific for revealing A-chain of molecule of Insulin, showed same result comparatively using of sections of Pancreas tissue (Fig. 1.4–1.6). Time for staining of sections in 0,4 % solution of Diethylpseudoisocyanine was reduced from 20 min. till 15 min. as was reduced time for washing of sections past staining procedures. This method showed marked decreasing of Insulin content in damaged B-cells (Fig. 1.5, 1.6) in compared with intact.

Aldehydefuchsin method showed analogical results (Fig. 1.7–1.9). A significant differences are revealed of state of histostructure as of Insulin content in damaged isolated islets comparatively with intact (Fig. 1.8, 1.9). Aldehydefuchsin method [AF] contrary to IF and PS is not belong to high specific because colours other hormones too. But for pancreatic B-cells not contained other hormones AF is specific for Insulin.

Haematoxylin and Eosin method using we obtained same result in compared with using sections of Pancreas tissue (Fig. 1.10–1.12.).

Staining of human embryon's pancreatic B-cells

Human embryon's 8–10 weeks old is not formed completely yet and is as small or more large groups of B-cells like small islets (Fig. 2.1–2.4.) contained a large amount of Insulin revealed by all histochemical methods used by us. Diethylpseudoisocyanine technic and Immunofluorescent method as fluorescent more sensitive methods demonstrated very positive reaction for Insulin in B-cells (Fig. 2.1, 2.3). Staining by Victoria 4R method showed intensive diffuse staining of cytoplasm of B-cells (Fig. 2.2). Aldehydefuchsin technic showed not intensive staining of B-cells (Fig. 2.4).

Scanning and Transmission electron microscopy analysis of isolates pancreatic islets

Pancreatic islets of 4–5 days old LEWIS Rats have oval or irregular shape (Fig. 3.1.). Surface layer of islet formed by A-cells which have spherical or oval shape (Fig. 3.2). A-cells have smooth surface (Fig. 3.2.). Islets treated by Diphenylthiocarbazone, a diabetogenic chelat active chemical, looked like the islets with clear signs of damage and destruction (Fig. 3.3.) and with evident damage of surface layer formed by A-cells (Fig. 3.4).

Transmission electron microscopy analysis showed results similar to the observed in the study of endocrine pancreas tissue. Cell matrix of B-cells of isolated islets as ultrastructures of cells without changes and contained multiple B-granules contained Insulin (Fig. 3.5, 3.6.)

Discussion

Analysis of results showed that using of histological and histochemical methods for staining of sections of isolated pancreatic islets have similar or equal to similar results obtained in pancreas tissue past staining by same methods. Fluorescent histochemical methods as Immunofluorescent reaction for Insulin as method using of Diethylpseudoisocyanine are more sensitive and identify the very low concentrations of investigated substances as 10^{-7} – 10^{-8} , that has been confirmed by our results. Meanwhile both these methods have a common fault: histological sections past completing of staining procedures are not permanent and must be investigated within short time. Both methods are belong to high specific for staining of Insulin or of A-chain of molecule of Insulin. These methods are more precise for measuring intensity of insulin staining in B-cells because no other structure of islets are stained.

More suitable for practical using is Aldehydefuchsin technic. Histological sections of pancreas tissue as of isolated islets stained by this method are permanent and can be stored for a long time. Aldehydefuchsin method is not belong to high specific for Insulin staining. It is known that some pituitary hormones can also be stained by Aldehydefuchsin method. Meanwhile for pancreatic islet's B-cells this method you can be

measured as specific for insulin because the other hormones in B-cells are not synthesized. Method Victoria 4R is high specific for Insulin and as Aldehydefuchsin technic gives an opportunity to obtain permanent histological sections. Quantitative estimation of insulin content in stained sections is based on measuring of absorbed by B-cells of light. However, both of these methods are belong to histological methods too and result staining not only of Insulin, but also other structures of B-cells which absorbed light as Insulin. Therefore, results of estimation of Insulin content in the B-cells by measuring of absorbance is not so precise as using fluorescent histochemical methods for Insulin staining.

We used significantly reduced time for fixation of Islets in Bouin from 24 h for pieces of pancreas tissue up to 15–30 min. for isolated Islets. Time for staining of sections of isolated islets by Diethylpseudoisocyanine was reduced to 15 min. comparatively with 20 min. for sections of pancreas tissue.

Acknowledgement

Authors are thankful for financial supporting of this investigation to Prof. John Turtle, a Honorary Vice-President of International Diabetes Federation (IDF) (Sydney, Australia), to Victor Riedl (Wien, Austria) and for free reagents to Dr Hans Langisch, Director of Eastern Europe Division of the Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany), to Dr Hans Niedderer, President of SERVA Finebiochemica GmbH (Heidelberg, Germany), Dr. Elizabeth Horn (Heidelberg, Germany), Dr. Johannes Watzek (Mannheim, Germany), Dr Peter Felch and Dr Robert Schilly (Wien, Austria), to Prof. Frank Wohlrab (Leipzig, Germany), Prof. Bernard Tuch (Sydney, Australia), Dr Harald Ritzel (Frankfurt, Germany), Dr Konrad Niethammer (Darmstadt, Germany), Dr Ch.Studer (Zurich, Switzerland) and to Dr Roland Thunberg (Uppsala, Sweden). Authors are thankful for help to Doz. G.T.Tusupbekova and Doz. A.P.Andreewa (Karaganda).

References

- 1 *Kvistberg D., Lester G., Lazarow A.* Staining of Insulin with Aldehydefuchsin // *J. Histochem. & Cytochem.* — 1966. — Vol. 14. — P. 104–111.
- 2 *Kikui Y., Segushi H., Mizuguti H.* A differential staining method for A- and B-cells in the pancreas islets of Langerhans // *Acta Histochem. & Cytochem.* — 1977. — Vol. 10, No. 1. — P. 10–13.
- 3 *Coalson R.E.* Pseudoisocyanin Staining of Insulin and Specificity of Emperical Islet Cell Stain // *Stain. Technologies.* — 1966. — No. 2. — P. 121–129.
- 4 *Meyramov G.G., Meyramova R.G.* The high Specificical Fluorescent Method Revealing of Zinc-ions in Pancreatic B-cells // *Diabetes, the Journal of American Diabetes Association.* — 1991. — Vol. 40, No. 5. — P. 65.
- 5 *Meyramov G.G., Kikimbaeva A.A., Meyramova A.G.* Victoria 4R Method Staining of Insulin in B-cells of Isolated Pancreatic Islets // *Acta Diabetologica, the European Diabetes Journal.* — Springer International, 2003. — Vol. 40, No. 4. — P. 208–209.
- 6 *Meyramov G.G., Kikimbaeva A.A., Meyramova A.G.* Fluorescent Histochemical method Staining of Insulin in B-cells of Isolated Pancreatic islets by Diethylpseudoisocyanine Chloride // *Acta Diabetologica, the European Diabetes Journal.* — Springer International, 2005. — Vol. 42, No. 1. — P. 66.

Ғ.Ғ.Мейрамов, К.-Д.Конерт, А.А.Қықымбаева, Г.Уолтерс, А.Ғ.Мейрамова

Оқшауланған ұйқыбез аралшықтардың В-жасушалары күйін талдауының гистохимиялық әдістері

Мақалада ағзаға енгізілген химиялық диабетогендік заттектердің ұйқыбез В-жасушаларына тікелей әсерін зерттеу үшін тін дақылының моделі оңтайлы екендігі дәлелденген. Авторлар В-жасушалардың гистокұрылымын және инсулиннің көлемін бағалау үшін оқшаланған ұйқыбез аралшықтардың дақылы моделіне негізгі гистологиялық және гистохимиялық әдістерді бейімдендірген. Аралшықтардың гистокұрылымының күйін бағалау үшін ең сапалы нәтижелерді альдегидфуксин әдісі, ал В-жасушаларда инсулиннің көлемін бағалау үшін ең нақты нәтижелерді иммунофлюоресценттік және псевдоизоцианинді әдістері көрсеткені айқындалған.

Г.Г.Мейрамов, К.-Д.Конерт, А.А.Кикимбаева, Г.Уолтерс, А.Г.Мейрамова

Гистохимические методы анализа состояния В-клеток изолированных панкреатических островков

В статье отмечено, что модель культуры ткани является наиболее оптимальной при изучении характера прямого действия химических диабетогенных веществ, а не продуктов их возможной метаболизации в организме, на панкреатические В-клетки. Авторами адаптированы к модели культуры изолированных панкреатических островков основные гистологические и гистохимические методы оценки состояния гистоструктуры и содержания инсулина в В-клетках. Показано, что наиболее качественные результаты оценки состояния гистоструктуры островков получены при использовании альдегидфуксинового метода, а наиболее точные результаты оценки содержания инсулина в В-клетках дает применение гистохимических флюоресцентных методов — иммунофлюоресцентного и псевдоизоцианинового.

M.A.Mukasheva, A.M.Aitkulov, S.Makisheva

*Ye.A.Buketov Karaganda State University
(E-mail: manara07@mail.ru)*

The modern approaches to studying of influence of heavy metals as environment factor on growth of malignant

In this article the main feature of action on people of carcinogenic agents is considered. These agents consist in large number of sources of their entry in environment and an organism of people, and complex combination of various factors. It creates certain difficulties on the track of a solution to the problem. The heavy metals played a significant part of environmental pollution. The understanding of processes of migration and transition of elements from one environment in another has great practical value for studying of mechanisms and ways of impact on a human body and estimation of level of toxicity of chemical elements.

Keywords: chemical elements, transformation, heavy metals, multiple-factor influence, migratory properties, adaptation, mutagen effect, carcinogenic properties.

Scientific problems of an environmental factors score on health of a human and justification of system of improving actions are priority problems of a state policy practically in all developed countries today. In this connection there is a need of advanced studying of a role of anthropogenic factors for formation of health of population. The situation is emerging in Kazakhstan causes complex multiple-factor impact of environment on population health that creates need to realize actions which are directed on concrete decision-making on control of condition of heavy metals in objects of environment in system « the environment — the human» [1].

Normal functioning of a human body is impossible without the optimum of microelements content. It is known, that as a part of an organism more than 60 elements contain in trace amount, and seven of them are obligate including manganese, zinc, copper. Their influence on physiological processes in an organism can be explained that microelements are a part so-called of «accessory substances» — respiratory pigments, vitamins, hormones, enzymes, and also the coenzymes participating in regulation of vital processes [2].

Microelements can be taken different components of soil, precipitate in form of insoluble salts. Possibilities of their transfer to an inactive condition aren't identical at different soils, distribution on a surface of soil is determined by many factors. It depends on features of pollutions sources, meteorological features of the region, geochemical factors, a landscape situation as a whole and other reasons [3]. Elements — toxicant polluting the soil, concentrate in upper layer (0–10 cm). It is established, that 57–74 % of lead and mercury at man-made injection of pollutants are fixed in a layer of 0–10 cm and only 3–8 % migrate up to the depth of 30–40 cm [4]. The important role in accumulation of heavy metals is played by complexes of secondary minerals with organic substance and iron and aluminum hydroxides. The great number of organic compounds is formed soluble or insoluble complexes with copper, in this connection ability of soils to connect copper or to contain it in the dissolved condition substantially depends on character and quantity of organic substance.

The significant role in increase of migratory properties of heavy metals is played by water-soluble organic compounds with which are connected 60–90 % of metals migrating in a soil profile. The understanding of migration processes and transition of elements from one environment in another has great practical value for studying of mechanisms and ways of impact on a human body, estimates of degree of toxicity of chemical elements. In accordance with observation, get in an organism of any one microelements in the increased concentration the contents and other microelements changes. The redistribution happening in the maintenance of microelements in organisms tissues during the earliest period of get of any microelements in increased or lowered concentration, has the adaptation and protective character directed on ensuring the best work of tissues and organs under changing conditions. In case of any microelements injected in an organism in concentration which exceed the adaptation potential necessary for normal activity of an organism, the equalized relations between microelements are broken and get out of control physiological regulation, and pathogenic action of this microelements starts being shown. Recently ecological conditionality about 20 diseases which were taking place among the population, including oncology [5] is established.

The highest carcinogenic risks have cadmium, arsenic, nickel, chrome. The carcinogenic action capacity of metals is characterized in the following way: arsenic > chrome > nickel > beryllium > lead > cadmium > mercury.

Under the influence of metals the different types of chromosomal aberration are induced. At the persons living in areas with intensive pollution by heavy metals: aluminum, nickel, chrome, etc., find changes in chromosomes of somatic cells. Mutagenic activity of some metals is shown on prevailing impact on genetic structures, and others — on metabolic derangements in cells. Heavy metals, passing placental barrier of pregnant women, get into an organism of a child and promote emergence of defective generation.

Excess concentration of metals can cause serious deranged biosynthesis and metabolic derangements that promotes decrease in nonspecific resistance of an organism, leads to disorders of the allergic and somatic status, and consequently, and to disorder of functions of various organs and systems.

There are information that derangements of balance of lead in an organism can prognosticate the tumor growth of cells. Excess of copper leads to hemodyscrasia, provokes development of anemia with liver regeneration. With dysbolism of copper in an organism connect early stages of development of malignant neoplasms. Zinc doesn't have specific toxic properties, however when it get in an organism in significant amounts causes gastric indigestion. Inorganic compounds of cadmium at chronic inhalation and oral introduction in an organism, along with the all-toxic are caused also by gonad- and embryotoxic actions. Manganese belongs to neurotropic metals, causes a hyperplasia of a thyroid gland. There are information of mutagenic effect of manganese, and also gonadotoxic action. Pathological processes in an organism caused by intake of manganese, is connected with of its' metabolism. At the end of the 80th years of XX century in experiments on animals transplacental carcinogenic action is shown for more than 60 substances and their combination, relating to various classes, including metals compounds, such as cobalt, zinc, magnesium, lead [6].

References

- 1 *Намазбаева З.И.* Совершенствование санитарно-гигиенической оценки условий проживания населения при современном развитии промышленности // Гигиена труда и мед. экология. — 2003. — № 1. — С. 12–17.
- 2 *Скальный А.В., Кудрин А.В.* Радиация, микроэлементы, антиоксиданты и иммунитет. — М.: Медицина, 2000. — 540 с.
- 3 *Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С.* Микроэлементозы человека. — М.: Медицина, 1991. — 496 с.
- 4 *Ноздрюхина Л.Р.* Биологическая роль микроэлементов в организме человека и животных. — М.: Наука, 1980. — 182 с.
- 5 *Панин М.С.* Химическая экология. — Семипалатинск, 2002. — 852 с.
- 6 *Напалков Н.П.* Рак и демографический переход // Вопросы онкологии. — 2004. — Т. 50, № 2. — С. 127–134.

М.А.Мұқашева, А.М.Айтқұлов, С.Мәкішева

Ауыр металдардың әсерінен қауіпті жасөсінділердің көбеюін қоршаған орта факторлары ретінде жаңа тұрғыдан зерттеу

Мақалада қоршаған орта мен адам ағзасына канцерогенді агенттердің түсу жолдарының көптігіне, әр түрлі факторлардың күрделі тіркестігіне байланысты олардың адамға әсерінің негізгі ерекшелігі қарастырылған. Осыған байланысты берілген мәселені шешу жолындағы негізгі қиындықтар туындайды. Қоршаған ортаның ластануындағы басты рөлді ойнайтын ауыр металдар. Адам ағзасына әсер ету жолдары мен механизмін оқып-білуге элементтердің бір ортадан екіншіге ауысу және миграциялау үдерістерін түсінудің, химиялық элементтердің токсикалық дәрежесін бағалаудың практикалық маңызы зор.

М.А.Мукашева, А.М.Айткулов, С.Макишева

Современные подходы к изучению воздействия тяжелых металлов как фактора окружающей среды на рост злокачественных новообразований

В статье рассмотрены особенности действия канцерогенных агентов на организм человека. Отмечено, что одними из основных загрязнителей окружающей среды являются тяжелые металлы. Сделан вывод, что понимание процессов миграции и перехода тяжелых металлов из одной среды в другую имеет большое практическое значение для изучения механизмов и путей воздействия на организм человека, оценки степени токсичности химических элементов.

References

- 1 Namazbaeva Z.I. *Occupational and medical ecology*, 2003, 1, p. 12–17.
- 2 Skalny A.V., Kudrin A.V. *Radiation, microelements, antioxidants and immunity*, Moscow: Meditsina, 2000, 540 p.
- 3 Avcin A.P., Zhavoronkov A.A., Rish M.A., Strochkova L.S. *Mikroelementoze of man*, Moscow: Meditsina, 1991, 496 p.
- 4 Nozdryukhina L.R. *A biological role of microelements is in the organism of man and animals*, Moscow: Nauka, 1980, 182 p.
- 5 Panin M.S. *Chemical ecology*, Semipalatinsk, 2002, 852 p.
- 6 Napalkov N.P. *Questions of oncology*, 2004, 50(2), p. 127–134.

Н.И.Атаманюк¹, Г.А.Тряпицына^{1,2}, И.А.Иванов³, А.В.Коновалов³, Е.А.Пряхин^{1,2}

¹Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск;

²Челябинский государственный университет;

³ФГУП ПО «Маяк», Озерск, Россия

(E-mail: pryakhin@yandex.ru)

Фитопланктон специального промышленного водоема В-17 ПО «Маяк»

В статье исследован фитопланктон специального промышленного водоема В-17 — хранилища радиоактивных отходов производственного объединения «Маяк». Показано, что радиоактивное загрязнение водоема определяется рядом радионуклидов: ⁹⁰Sr ($1,4 \times 10^5$ Бк/л в воде, $2,0 \times 10^7$ Бк/кг сухого веса в донных отложениях), ¹³⁷Cs ($3,7 \times 10^4$ Бк/л в воде, $5,6 \times 10^7$ в донных отложениях), ³H ($1,6 \times 10^6$ Бк/л в воде), а также ²³⁴U, ²³⁸U, ²⁴¹Am, ²³⁸Pu, ²³⁹Pu, ²⁴⁰Pu, ⁶⁰Co. Рассчитана мощность поглощенной дозы для фитопланктона, которая составила 1,7 Гр/сут. Отмечено, что, помимо радиоактивного загрязнения, для водоема наблюдается высокое содержание нитратов (2,5 г/л). Показано, что фитопланктонное сообщество водоема в 2008–2012 гг. отличалось низким видовым разнообразием, было представлено преимущественно цианобактериями, среди которых 60–99 % от числа всех клеток составляли цианобактерии *Geitlerinema amphibium*. По результатам наблюдений установлено, что уровень загрязнения, свойственный водоему В-17, не сдерживает количественного роста фитопланктона, однако вызывает изменения видовой структуры, снижение видового разнообразия и подавляющее развитие одного, высокоустойчивого вида. Выделено, что по показателям фитопланктона в экосистеме водоема наблюдаются признаки экологического регресса.

Ключевые слова: радиоактивное загрязнение, биосфера, водоем, гидробиоценоз, биомасса, депонирование, радионуклиды, фитопланктон, альгоценоз, цианобактерии, камера Горяева, радионуклиды (²⁴¹Am, ²³⁸Pu, ²³⁹Pu, ²⁴⁰Pu).

Введение

Водоем № 17 (В-17), или так называемое «Старое болото», является старейшим из промышленных водоемов-хранилищ радиоактивных отходов предприятия атомной промышленности производственного объединения «Маяк» (ПО «Маяк») [1]. В настоящее время этот водоем используется для хранения среднеактивных отходов и сброса низкоактивных радиоактивных отходов (третиевых конденсатов) [1, 2]. В водоем поступают также химические загрязнители — нитрат натрия и высокотоксичные органические соединения. Водоем В-17 по уровню радиоактивного загрязнения уступает только озеру Карачай. В настоящее время это водоемы с самыми высокими уровнями радиоактивного загрязнения в биосфере [3]. На данный момент в водоеме В-17 депонировано около 1 млн Ки среднеактивных отходов.

Радиационная обстановка и показатели загрязнения водоема В-17 постоянно контролируются в рамках программы штатного производственного экологического мониторинга ПО «Маяк». В районе водоема выполнен большой объем экспериментальных работ, однако большая часть из них касается собственно радиоактивного загрязнения, миграции радионуклидов и вопросов промышленной эксплуатации водоема. Комплексные гидробиологические исследования на водоеме В-17 были начаты в 2008 г. [4].

В водных экосистемах особенности биоты определяют скорость и эффективность процессов самоочищения, условия формирования свойств водной среды. Изучение компонентов экосистемы водоема В-17 представляется важной научной задачей с точки зрения исследования адаптации живых организмов к экстремальным уровням радиоактивного загрязнения, разработки эффективных мероприятий по защите окружающей среды и здоровья человека, а также возможности прогнозировать состояние экосистем, подвергшихся радиоактивному загрязнению.

Важнейшим компонентом водных экосистем, одним из средообразующих факторов, определяющих условия существования других гидробионтов, является фитопланктон. Фитопланктон быстро реагирует на любые изменения внешних условий, а изменения в составе и структуре альгоценоза непременно повлекут за собой цепь реакций в стоящих выше звеньях гидробиоценозов. Обладая огромной площадью сорбционной поверхности и выраженной способностью накапливать радионуклиды, фитопланктон в радиоактивно загрязненных водоемах играет заметную роль в процессах миграции и самоочищения воды [5].

Цель настоящей работы — оценить состояние фитопланктонного сообщества специального промышленного водоема В-17 по результатам наблюдений 2008–2012 гг.

Материалы и методы

Водоем В-17 представляет собой искусственный водоем, расположенный в естественной впадине рельефа. Начало сбросов радиоактивных отходов в Старое болото относится к 1949 г. В 1952 и 1954 гг. были построены дамбы, исключая попадание воды из водоема В-17 в открытую гидрографическую сеть. Площадь водного зеркала водоема составляет 0,13 км², а объем — 0,36 млн м³ [1–3]. Максимальная глубина достигает 6,5 м, средняя — 2,8 м.

Пробы фитопланктона, воды, донных отложений отбирали на трех станциях, показанных на рисунке 1. Две станции — В17/1 (глубина 1,3 м) и В17/3 (глубина 1,4 м) располагались у северного и южного концов плотины, станция В17/4 (глубина 2,6 м) — в западной части водоема, напротив устья существовавшего прежде ручья.

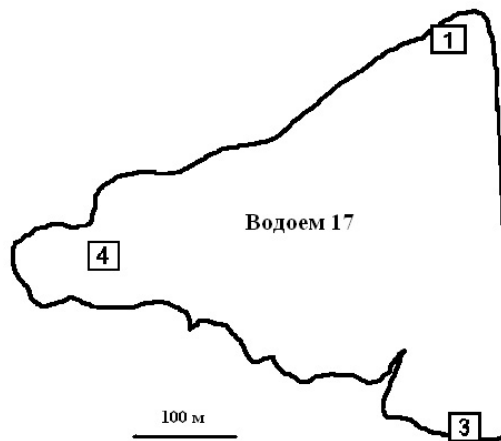


Рисунок 1. Станции отбора проб на водоеме В-17

Пробы воды отбирали из подповерхностного горизонта, донные отложения — с помощью ковшевого дночерпателя. Определение содержания радионуклидов в воде, донных отложениях и фитопланктоне проводили в 2009 г. Фитопланктон отбирали и обрабатывали по стандартным гидробиологическим методам [6, 7]. Исследовали летний комплекс фитопланктона. Пробы отбирали в августе 2008 г., в июне, июле и августе 2009 и 2010 гг., в мае и августе 2011 г., в августе 2012 г.

Для количественного анализа фитопланктона пробы консервировали на месте фиксатором, приготовленным на основе раствора Люголя. В лаборатории пробы концентрировали фильтрационным методом, используя мембранный фильтр МФАС-ОС-2 с диаметром пор 0,45 мкм [6, 7]. Для отбора проб фитопланктона на качественный анализ использовали сачок для фитопланктона из мельничного газа № 160. Отбор проводили в поверхностном горизонте. При определении общего числа видов для каждой станции учитывались виды, определенные в количественной и качественной пробах.

Просмотр проб фитопланктона производился при помощи микроскопа Nikon Eclipse 50i при 400-кратном увеличении, с идентификацией видов в камере Горяева с использованием соответствующих определителей [8–11]. В качестве счетной единицы при определении численности принята клетка.

Биомассу фитопланктона определяли объемно-весовым методом, исходя из оценки численности каждого таксона и объема клеток особей данного таксона, приравнивая удельную массу водорослей к 1 (1 г сырой биомассы приравняется к 10¹² мкм³) [12]. Объемы клеток, соответствующие геометрическим фигурам, приравнивали к шару, цилиндру, двум сопряженным конусам, эллипсоиду, вытянутому сфероиду и т.д. [13]. Объемы клеток сложной формы рассчитывали как сумму объемов отдельных простых фигур.

Пробоподготовку и определение удельной активности в пробах воды, донных отложениях и фитопланктоне проводили согласно методическим рекомендациям по санитарному контролю за содержанием радиоактивных веществ в объектах внешней среды [14]. Удельную активность радионуклидов в воде и донных отложениях определяли для каждой станции отбора проб, затем рассчитывали среднее значение по акватории водоема.

Концентрацию ^{137}Cs , ^{60}Co , ^{241}Am в пробах определяли гамма-спектрометрическим методом на установке с полупроводниковым детектором ДГДК-80В-3 и компьютеризированным анализатором типа LP-4900В фирмы Nokia. Погрешность измерений не превышала 20 %. Концентрацию ^{90}Sr в пробах определяли посредством радиохимического выделения ^{90}Y , с последующим измерением его активности на малофоновой β -метрической установке типа УМФ-1500 и УМФ-2000 и пламенно-фотометрическим контролем выхода носителя стронция. Погрешность измерения ^{90}Sr составляла 10 %. Определение изотопов плутония проводили альфа-спектрометрическим методом после концентрирования и очистки на анионообменной смоле и электролитического выделения на стальные мишени. В качестве индикаторной метки использовали ^{236}Pu . Измерение трития в водных пробах проводилось на альфа-, бета-радиометрической установке Quantulus-1220 жидкостно-сцинтилляционным методом после очистки перегонкой. Изотопы урана в воде определяли альфа-спектрометрическим методом после экстракции ТБФ и электролитическим осаждением на стальные мишени.

С помощью программного комплекса ERICA Assessment Tool 1.0 рассчитывали мощность поглощенной дозы для фитопланктона, обусловленную внутренним и внешним облучением. В расчетах использовали фактические уровни загрязнения воды и донных отложений радионуклидами, а также фактические концентрации ^{137}Cs и ^{90}Sr в фитопланктоне. Для определения мощности поглощенной дозы для альфа-излучающих радионуклидов использовали коэффициенты накопления из библиотеки ERICA. При расчете мощностей доз использовали следующие коэффициенты качества: для альфа-излучения — 10, для бета- и гамма-излучения — 1, для низкоэнергетического бета-излучения — 3. Доля сухого вещества в донных отложениях по результатам собственных определений принималась равной 44,1 % (среднее значение). Геометрия и параметры биологического объекта (фитопланктон) соответствовали стандартным данным библиотеки ERICA.

Результаты

Содержание радионуклидов в воде, донных отложениях, фитопланктоне

В таблице 1 приведены средние значения удельной активности радионуклидов в воде и донных отложениях водоема В-17.

Т а б л и ц а 1

Содержание радионуклидов в воде исследуемых водоемов, Бк/л (по данным на 2010 г.)

Радионуклиды	Активность в воде	Активность в донных отложениях
^{137}Cs	$3,7 \times 10^4$	$5,6 \times 10^7$
^{90}Sr	$1,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^7$
^3H	$1,6 \times 10^6$	—
^{234}U	$1,9 \times 10^1$	—
^{238}U	$1,1 \times 10^1$	—
^{241}Am	$5,0 \times 10^1$	$5,8 \times 10^6$
^{238}Pu	$1,7 \times 10^1$	$5,1 \times 10^5$
$^{239, 240}\text{Pu}$	$1,7 \times 10^1$	$3,4 \times 10^6$
^{60}Co	—	$4,7 \times 10^4$

Примечание. «—» — не проводили измерения показателя.

Радиоактивное загрязнение воды определяется главным образом ^{90}Sr ($1,4 \times 10^5$ Бк/л), ^{137}Cs ($3,7 \times 10^4$ Бк/л) и высоким содержанием трития. Присутствуют также альфа-излучающие радионуклиды. Активность этих радионуклидов в донных отложениях была выше, чем в воде, и составила для ^{137}Cs $5,6 \times 10^7$ Бк/кг сухой массы, для ^{90}Sr $2,0 \times 10^7$ Бк/кг сухой массы. Содержание альфа-излучающих радионуклидов (^{241}Am , ^{238}Pu , $^{239, 240}\text{Pu}$) в донных отложениях также было значительно выше, чем в воде (от $5,1 \times 10^5$ для ^{238}Pu до $5,8 \times 10^6$ Бк/кг сухой массы для ^{241}Am). Кроме того, в донных отложениях было выявлено довольно высокое содержание ^{60}Co .

По результатам измерений содержания радионуклидов в фитопланктоне удельная активность ^{137}Cs составила $1,3 \times 10^5$ Бк/кг сырого веса, удельная активность ^{90}Sr — $4,2 \times 10^5$ Бк/кг сырого веса. Коэффициенты накопления (отношение активности радионуклида в фитопланктоне к активности в воде) для ^{137}Cs и ^{90}Sr оказались близки — 3,5 и 3 соответственно (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Содержание ^{90}Sr и ^{137}Cs в фитопланктоне водоема В-17

Радионуклид	Удельная активность в фитопланктоне, Бк/кг сырого веса	Коэффициент накопления
^{90}Sr	$4,2 \times 10^5$	3,0
^{137}Cs	$1,3 \times 10^5$	3,5

Нужно отметить, что для исследуемого водоема характерно также химическое загрязнение, в воде регистрируется высокое суммарное содержание солей, концентрация нитратов в воде составляет 2,5 г/л, что в 63 раза больше предельно допустимой концентрации для водоемов, используемых в рыбохозяйственных целях (40 мг/л), сухой остаток составляет 4 г/л [4].

Мощность поглощенной дозы для фитопланктона

Расчитанная мощность поглощенной дозы для фитопланктона водоема В-17 составила 1,7 Гр/сут (табл. 3). Фактически эта величина определялась мощностью только внутреннего облучения.

Т а б л и ц а 3

Мощность поглощенной дозы для фитопланктона водоема В-17

Мощность поглощенной дозы, Гр/сут		
внешней	внутренней	общей
0,018	1,7	1,7

Расчеты, выполненные с использованием программы ERICA, показали, что мощность поглощенной дозы для фитопланктона определяли альфа-излучающие радионуклиды (1,7 Гр/сут), превышая вклад ^{137}Cs ($4,1 \times 10^{-1}$ мГр/сут) и ^{90}Sr ($2,2 \times 10^0$ мГр/сут), вместе взятых. Однако для альфа-излучателей при расчете дозы использовались коэффициенты накопления из библиотеки программы ERICA Assessment Tool 1.0. Коэффициенты накопления радионуклидов гидробионтами в программе ERICA были определены для водоемов с более низкими уровнями загрязнения, чем водоемы ПО «Маяк». Коэффициенты накопления ^{137}Cs и ^{90}Sr для фитопланктона, полученные в наших исследованиях, оказались ниже значений коэффициентов, предлагаемых программой ERICA. Можно предположить, что мощность поглощенной дозы от альфа-излучающих радионуклидов в данных расчетах несколько завышена. Для прояснения этого вопроса необходимо измерить содержание альфа-излучающих радионуклидов в пробах фитопланктона водоема В-17.

Фитопланктон водоема В-17

На протяжении периода наблюдений в фитопланктоне водоема В-17 регистрировалось от 11 до 38 одновременно вегетирующих видов. Среднее число видов, встречаемое в одной пробе, редко превышало 20 (табл. 4). Такие значения существенно ниже числа видов, регистрируемых в пробах других промышленных водоемов ПО «Маяк», с меньшими уровнями антропогенного загрязнения, а также озер Южного Урала, не подверженных радиационному воздействию [15].

Т а б л и ц а 4

Число видов фитопланктона

Дата	Количество видов общее / в среднем в пробе	Цианобактерии	Зеленые	Диатомовые	Другие
Август 2008 г.	14 / 11	4	5	3	2
Июнь 2009 г.	26 / 18	4	10	8	4
Июль 2009 г.	23 / 16	7	8	5	3
Август 2009 г.	38 / 28	8	14	9	6
Июнь 2010 г.	11 / 11	1	5	4	1
Июль 2010 г.	13 / 13	1	8	3	1
Август 2010 г.	25 / 18	4	14	5	2
Май 2011 г.	14 / 14	1	4	8	1
Август 2011 г.	17 / 12	5	6	5	1
Август 2012 г.	20 / 12	9	7	4	0

Наибольшим видовым разнообразием, как правило, отличались зеленые водоросли. Наблюдения 2009–2010 гг. показали, что видовое разнообразие фитопланктона в водоеме возрастает в августе, что характерно и для других водоемов той же географической области (период «гидробиологического лета», когда в водоемах максимально активны продукционные процессы).

В таблице 5 приведены показатели количественного развития фитопланктона водоема В-17 — численность, биомасса, а также относительный вклад в эти показатели цианобактерий.

Т а б л и ц а 5

Показатели количественного развития фитопланктона

Дата	Численность, млн клеток/л	% цианобактерий от численности	Биомасса, мг/л	% цианобактерий от биомассы
Август 2008 г.	0,78	64	0,06	35
Июнь 2009 г.	482,0	99	5,56	95
Июль 2009 г.	2 430	99	35,5	45
Август 2009 г.	1 050	98	16,0	71
Июнь 2010 г.	1 449	99	28,6	93
Июль 2010 г.	577,2	99	11,3	93
Август 2010 г.	245,1	69	15,9	21
Май 2011 г.	2 017	70	39,9	90
Август 2011 г.	52,8	86	1,32	91
Август 2012 г.	704,0	98	14,0	98

В разные периоды наблюдения численность фитопланктона колебалась в очень широких пределах — от 780 тыс. кл./л в августе 2008 г. до 2 млрд кл./л в июле 2009 и мае 2011 гг. Биомасса фитопланктона при этом изменялась от 0,06 до 40 мг/л. Численность и биомасса фитопланктона — очень динамичные показатели, которые существенно колеблются в течение вегетационного периода, но изменения в таких широких пределах, происходящие в столь короткие сроки, а также достижение численности клеток водорослей значений в несколько миллиардов не наблюдались нами в других исследованных водоемах Южного Урала [15]. Год от года динамика численности и биомассы фитопланктона в течение лета носила разнонаправленный характер, что может быть связано с климатическими условиями.

В структуре альгоценоза по численности всегда преобладали цианобактерии, составляя от 64 до 99 % от общей численности фитопланктона. Достаточно часто на цианобактерии приходилось также более 90 % (за исключением августа 2008 г., июля–августа 2009 г., августа 2010 г.) от общей биомассы фитопланктона.

В 2008 г. наибольший вклад в численность фитопланктона вносили цианобактерии *Aphanocapsa holsatica* (Lemm.) Cronb. et Kom. и *Geitlerinema amphibium* Ag. ex Gom. (в сумме 64 % от общей численности), при этом 25 % от всего числа клеток приходилось на зеленые водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer.

Начиная с 2009 г. в составе альгоценоза безусловно доминировали цианобактерии *Geitlerinema amphibium* (синоним *Oscillatoria amphibia*). Это эвритопный, широко распространенный, космополитный, планктонно-перифитонный вид [11]. Как правило, на фоне снижения численности *Geitlerinema amphibium* происходило повышение видового разнообразия и численности других водорослей.

В 2009 г. количество клеток этого вида в разное время составляло от 98 до 99 % от общей численности, от 71 до 95 % от общей биомассы.

В начале и конце июня 2010 г. *Geitlerinema amphibium* формировала более 99 % численности и более 93 % биомассы фитопланктона. В августе 2010 г. в фитопланктоне водоема В-17 произошла перестройка: снизились численность и биомасса водорослей, а также относительный вклад в эти показатели цианобактерий. Сформировалась полидоминантная структура с кодоминированием цианобактерий *Geitlerinema amphibium* и зеленых водорослей *Chlorella vulgaris*.

В мае 2011 г. *Geitlerinema amphibium* составляла 70 % от всей численности фитопланктона и 90 % от биомассы, в августе — в среднем 84 % от численности и 85 % от биомассы. На втором месте по количеству снова были зеленые водоросли *Chlorella vulgaris*. Количественные показатели фитопланктона в мае были очень высокими (2 млрд кл./л, 40 мг/л), в августе же снизились в десятки раз (53 млн кл./л, 1,3 мг/л).

В августе 2012 г. на долю *Geitlerinema amphibium* приходилось 98 % численности и 98 % биомассы всего фитопланктонного сообщества.

Среди других видов, встречающихся в водоеме регулярно, можно отметить зеленые водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Brebisson, *Monoraphidium minutum* (Nag.) Kom.-Legn., диатомовые *Chaetoceros Muelleri* Lemm, *Navicula longirostris* Hust. Их вклад в формирование летнего комплекса фитопланктона можно считать несущественным, однако они встречались почти во всех пробах, отобранных на водоеме В-17 в течение 2008–2012 гг. Другие виды были отмечены единично.

Почти все зарегистрированные в водоеме В-17 микроводоросли по своим экологическим характеристикам являются эвритермными, галофильными, алкалофильными, эврисапробными либо индифферентными к перечисленным факторам космополитными видами, обитающими как в стоячих, так и текущих водах [16].

Обсуждение

За время наблюдений для фитопланктона водоема В-17 были отмечены следующие характерные особенности. Численность и биомасса фитопланктона в летний период достигала очень высоких значений. Доминирующий здесь вид цианобактерий имеет небольшие размеры клеток, и при биомассе 20–40 мг/л общая численность фитопланктона составляла от нескольких сотен миллионов до миллиардов клеток на литр. Хотя были отмечены также и периоды спада массового развития водорослей (минимальные значения — в августе 2008 г.), уровень загрязнения, свойственный для водоема В-17, по всей видимости, не препятствует высокой продукции вегетирующих здесь видов.

Однако более чувствительными к действию загрязнения оказались показатели видового богатства — отмечено низкое число видов планктонных водорослей, структура альгоценоза практически однородна: обычны ситуации, когда на один вид приходится 99 % от общей численности всего фитопланктона. Доминируют в альгоценозе цианобактерии *Geitlerinema amphibium*, очень редко на позицию кодоминанта выходили зеленые водоросли *Chlorella vulgaris*.

Указанные особенности фитопланктона водоема В-17 могут быть проявлениями экологического регресса экосистемы. В благоприятных условиях число видов велико, но каждый из них представлен небольшим количеством особей. В сообществах экстремальных местообитаний нарушаются биоценотические связи из-за выпадения отдельных чувствительных видов, снижается видовое разнообразие, что приводит к ослаблению межвидовой конкуренции, потере устойчивости сообщества (широкие колебания биомассы) и упрощению структуры сообщества (доминирующее развитие одного высокотолерантного, но узкоспециализированного вида) [17].

Причиной такой деградациии могут быть как радиационный, так и химический факторы.

Рассчитанная для фитопланктона В-17 мощность поглощенной дозы 1,7 Гр/сут (0,07 Гр/час) представляется заметной величиной. Значения ЛД₅₀ для фитопланктона находятся в пределах от нескольких десятков до нескольких сотен Гр острого облучения [18]. В литературе приводятся экспериментально определенные дозы ЛД₅₀ для водорослей в пределах от 45 до 120 Гр [19]. Для сообщества почвенных водорослей в природных условиях было определено, что при мощности дозы более 0,4 Гр/час количественные показатели сообщества снижались, при 0,9 Гр/час это снижение достигало 50 %, при мощности дозы облучения 2,5–3,0 Гр/час сообщество практически исчезало [20]. В другом исследовании рассчитанная с помощью математической модели мощность дозы, при которой в модельном альгоценозе начинали регистрироваться изменения, составила 10,4 мГр/час, а ЛД₅₀ для фитопланктона, по данным этих же авторов, — 151 Гр [21].

Кроме того, водоем В-17 отличается высоким содержанием нитратов (2,5 г/л), в то время как наиболее благоприятные условия для существования озерного планктона создаются при содержании солей от 0,1 до 1 г/л.

На примере различных соленых водоемов, расположенных по всему миру, было показано, что с увеличением минерализации снижаются видовое разнообразие, численность и биомасса фитопланктона, зоопланктона, зообентоса [22–24]. Отмечено, что для таких водоемов характерно преобладание цианобактерий, в высокоминерализованных озерах регистрировали до 10–40 одновременно вегетирующих видов водорослей [25–28].

В естественных водоемах суши минерализация определяется главным образом хлоридами, сульфатами и карбонатами. Высокий уровень нитратов может оказывать токсическое действие на фитопланктон водоема В-17.

В обзоре, посвященном эффектам загрязнения неорганическим азотом водных экосистем [29], авторы пришли к выводу, что отрицательного воздействия на гидробионтов не оказывает содержание общего азота в пределах 0,5–1,0 мг/л. В водоеме В-17 эти уровни превышены.

В модельных экспериментах по оценке комбинированного действия острого гамма-облучения и нитратов на рост лабораторной культуры зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* нами было показано, что при сочетанном действии нитрат-иона и радиационного фактора с уровнями, характерными для водоема В-17, угнетение развития зеленых водорослей, вероятнее всего, определяется воздействием нитратов [30].

Для цианобактерий в целом, а для порядка Oscillatoriales (род *Geitlerinema*) в особенности, характерно развитие в самых экстремальных гидрохимических условиях [31]. Цианобактерии являются также обычными обитателями минерализованных вод [22, 27]. Интересно отметить, что *Geitlerinema amphibium* в 2009–2012 гг. в состоянии, близком к монокультуре, развивалась в озере Карачай, превосходящем водоем В-17 по уровню радиоактивного загрязнения и сопоставимом с водоемом В-17 по нитратному загрязнению и общей минерализации [32].

В целом состояние экосистемы водоема В-17 по показателям развития фитопланктона может быть охарактеризовано как нестабильное, проявляющее признаки экологического регресса, обусловленного, по-видимому, комбинированным действием радиоактивного и химического факторов.

Список литературы

- 1 Стукалов П.М. Промышленный водоем ПО «Маяк» Старое болото. Общая характеристика и история эксплуатации // Вопросы радиационной безопасности. — 2000. — № 1. — С. 50–60.
- 2 Стукалов П.М. Промышленный водоем ПО «Маяк» Старое болото. Динамика радиоактивного загрязнения водоема в 1949–2002 гг. // Вопросы радиационной безопасности. — 2004. — № 4. — С. 19–34.
- 3 Стукалов П.М. Радиоактивное загрязнение промышленного водоема ПО «Маяк» Старое болото. Обзор результатов исследовательских работ (1949–2006 годы) Ч. 1 // Библиотека журнала «Вопросы радиационной безопасности». — 2007. — № 10. — 136 с.
- 4 Пряхин Е.А., Стукалов П.М., Дерябина Л.В., Гаврилова Е.В., Тряпицына Г.А., Ровный С.И., Аклеев А.В. Некоторые показатели состояния биоты водоема В-17. Пилотные исследования // Вопросы радиационной безопасности. — 2009. — Спец. вып. № 1(8). — С. 87–92.
- 5 Гусева В.П., Чеботина М.Я., Трапезников А.В. Исследование фито- и зоопланктонных организмов как биоиндикаторов радиоактивного загрязнения воды в районе размещения предприятий ЯТЦ // Вопросы радиационной безопасности. — 2006. — № 4. — С. 70–75.
- 6 Абакумов В.А. Руководство по гидробиологическому мониторингу пресноводных экосистем. — СПб., 1992. — 318 с.
- 7 Садчиков А.П. Методы изучения пресноводного фитопланктона. — М., 2003. — 157 с.
- 8 Определитель пресноводных водорослей СССР. Т. 1–14. — М.-Л., 1951–1986 гг.
- 9 Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. — Киев, 1990. — 207 с.
- 10 Водоросли, вызывающие «цветение» водоемов северо-запада России / Белякова Р.Н., Волошко Л.Н., Гаврилова О.В. и др. — М., 2006. — 367 с.
- 11 Kotarek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota. 2nd Part: Oscillatoriales. — Munchen: Elsevier GmbH, 2005. — 760 p.
- 12 Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах: Фитопланктон и его продукция / Под ред. Г.Г.Винберга. — Л., 1984. — 31 с.
- 13 Брянцева Ю.В., Лях А.М., Сергеева А.В. Расчет объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Черного моря. — Севастополь, 2005. — 25 с.
- 14 Методические рекомендации по санитарному контролю за содержанием радиоактивных веществ в объектах внешней среды / Под ред. А.Н.Мареза, А.С.Зыковой. — М.: Минздрав СССР, 1980. — 36 с.
- 15 Духовная Н.И., Осипов Д.И., Тряпицына Г.А., Пряхин Е.А., Стукалов П.М. Влияние радиоактивного и химического загрязнения водоемов ПО «Маяк» на состояние фитопланктонных сообществ // Вопросы радиационной безопасности. — 2011. — № 2. — С. 24–36.
- 16 Баринова С.С., Медведев, Л.А., Анисимова О.В. Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды. — Тель Авив: PiliesStudio, 2006. — 498 с.
- 17 Fleeger J.W., Carman K.R., Nisbet R.M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems // Sci. Total Environ. — 2003. — Vol. 317. P. 207–233.
- 18 UNSCEAR Report to the General Assembly. Sources and effects of ionizing radiation. — United nations, New York, 1996.
- 19 Polikarpov G.G. Radioecology of Aquatic Organisms (English translation edited by V.Schultz and A.W.Klement). — New York: Reinhold, 1966.
- 20 Franz E.H., Woodwell G.M. Effects of chronic gamma irradiation on the soil algal community of an oak-pine forest // Radiat. Bot. — 1973. — Vol. 13. — P. 323–329.
- 21 Wilson R.C., Vives i Batlle J., Watts S.J., McDonald P., Jones S.R., Craze A. An approach for the assessment of risk from chronic radiation to populations of phytoplankton and zooplankton // Radiat. Environ. Biophys. — 2010. — Vol. 49. — P. 87–95.

- 22 Balushkina E.V., Golubkov S.M., Golubkov M.S., Litvinchuk L.F., Shadrin N.V. Effect of abiotic and biotic factors on the structural and functional organization of the saline lake ecosystems in Crimea // Zh. Obshch. Biol. — 2009. — Vol. 70, No. 6. — P. 504–514.
- 23 Alcocer J., Hammer U.T. Saline lake ecosystems of Mexico // Aquatic Ecosystem Health and Management. — 1998. — Vol. 1, No. 3–4. — P. 291–315.
- 24 Medina-Junior P.B., Rietzler A.C. Limnological study of a Pantanal saline lake // Braz. J. Biol. — 2005. — Vol. 65, No. 4. — P. 651–659.
- 25 Salm C.R., Saros J.E., Martin C.S., Erickson J.M. Patterns of seasonal phytoplankton distribution in prairie saline lakes of the northern Great Plains (USA) // Saline Systems. — 2009. — Vol. 5. — P. 1.
- 26 Walker K.F. The seasonal phytoplankton cycles of two saline lakes in central Washington // Limnology and Oceanography. — 1975. — Vol. 20, No. 1. — P. 40–53.
- 27 Khan T.A. Limnology of four saline lakes in western Victoria, Australia: I-II. Physico-chemical parameters. Biological parameters // Limnologia — Ecology and Management of Inland Waters. — 2003. — Vol. 33. — P. 316–339.
- 28 Митрофанова Е.Ю. Фитопланктон озер разной минерализации (на примере системы реки Касмалы, Алтайский край) // Вестн. Алтайского гос. аграрного ун-та. — 2010. — Т. 68. — С. 67–72.
- 29 Camargo J.A., Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment // Environ. Int. — 2006. — Vol. 32, No. 6. — P. 831–849.
- 30 Тряпицына Г.А., Тарасова С.П., Духовная Н.И., Осипов Д.И., Пряхин Е.А. Экспериментальная оценка сочетанного действия нитратов и острого γ -облучения на рост зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda* // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2012. — Т. 52, № 3. — С. 298–304.
- 31 Сопрунова О.Б. Циано-бактериальные ассоциации — перспективные агенты реабилитации техногенных экосистем // Проблемы и перспективы реабилитации техногенных экосистем: Материалы Междунар. конф. — Астрахань, 2005. — С. 33–38.
- 32 Пряхин Е.А., Тряпицына Г.А., Атаманюк Н.И., Осипов Д.И., Иванов И.А., Попова И.Я., Аклеев А.В. Фито- и зоопланктон специального промышленного водоема В-9 (озеро Карачай) // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2012. — Т. 52, № 4. — С. 419–427.

Н.И.Атаманюк, Г.А.Тряпицына, И.А.Иванов, А.В.Коновалов, Е.А.Пряхин

«Маяк» ОБ В-17 арнайы өнеркәсіптік су қоймасындағы фитопланктон

«Маяк» ОБ радиоактивтік қалдықтарының қоймасы — В-17 арнайы өнеркәсіптік су қоймасындағы фитопланктон зерттелді. Су қоймасының радиоактивтік ластануы бірқатар радионуклидтермен анықталды: ^{90}Sr ($1,4 \times 10^5$ Бк/л в воде, $2,0 \times 10^7$ Бк/кг су түбіндегі қабаттарының құрғақ салмағы), ^{137}Cs ($3,7 \times 10^4$ Бк/л суда, $5,6 \times 10^7$ су түбіндегі қабаттары), ^3H ($1,6 \times 10^6$ Бк/л суда) және ^{234}U , ^{238}U , ^{241}Am , ^{238}Pu , ^{239}Pu , ^{240}Pu , ^{60}Co . Фитопланктон үшін игерілген мөлшердің есептелген қуаты 1,7 Гр/тәул. құрады. Радиоактивтік ластанудан басқа, су қоймасында нитраттардың жоғарғы мөлшері (2,5 г/л) анықталды. 2008–2012 жылдары су қоймасындағы фитопланктондық топтанудың әр түрлілігі төмен болды, көбінесе цианобактериялар, соның ішінде 60–99 % *Geitlerinema amphibium* цианобактериялары. Зерттеу нәтижесін қорытындыласақ, В-17 су қоймасының ластану мөлшері фитопланктонның сандық өсуін тежемейді, бірақ түрдің құрылымын өзгертеді және жоғары орнықты түрдің дамуын басады. Фитопланктонның көрсеткіші бойынша су қоймасының экожүйесінде экологиялық регрестің белгісі байқалады.

N.I.Atamanyuk, G.A.Tryapitsyna, I.A.Ivanov, A.V.Konovalev, E.A.Pryakhin

Phytoplankton in special industrial pond R-17 of the «Mayak» PA

The status of the phytoplankton community in R-17, storage reservoir of liquid medium-level radioactive waste of the Mayak Production Association, Chelyabinsk Region, Russia, is reviewed. The water body is contaminated by a number of radionuclides: ^{90}Sr (1.4×10^5 Bq L $^{-1}$ in water, 2.0×10^7 Bq kg of dry weight $^{-1}$ in the sediments), ^{137}Cs (3.7×10^4 Bq L $^{-1}$ in water, 5.6×10^7 Bq kg of dry weight $^{-1}$ in the sediments) ^3H (1.6×10^6 Bq L $^{-1}$ in water) and ^{234}U , ^{238}U , ^{241}Am , ^{238}Pu , ^{239}Pu , ^{240}Pu , ^{60}Co . The estimated absorbed dose rate for phytoplankton was 1.7 Gy day $^{-1}$. In addition to the radioactive contamination, an increased level of nitrates was observed in the reservoir — 2.5 g L $^{-1}$. In 2008–2012 phytoplankton community of the R-17 characterized by low species diversity, algae were represented mainly by cyanobacteria, 60–99 % of all algae cells formed by cyanobacteria *Geitlerinema amphibium*. It can be concluded that the level of pollution of R-17 does not prevent the growth of phytoplankton amount; however, it changes species composition, reduces species diversity and causes the vast development of only one highly resistant species. These are signs of ecological retrogression in the reservoir ecosystem.

References

- 1 Stukalov P.M. *Problems of radiation safety*, 2000, 1, p. 50–60.
- 2 Stukalov P.M. *Problems of radiation safety*, 2004, 4, p. 19–34.
- 3 Stukalov P.M. *Library of «Problems of radiation safety» Journal*, 2007, 10, 136 p.
- 4 Pryahin E.A., Stukalov P.M., Deryabina L.V., Gavrilova E.V., Tryapitsyna G.A., Rovnyi S.I., Akleyev A.V. *Problems of radiation safety*, 2009, 1(8), p. 87–92.
- 5 Guseva V.P., Chebotina M.Ya., Trapeznikov A.V. *Problems of radiation safety*, 2006, 4, p. 70–75.
- 6 Abakoumov V.A. *Guide to hydrobiological monitoring of freshwater ecosystems*, St. Petersburg, 1992, 318 p.
- 7 Sadchikov A.P. *Methods of study of freshwater phytoplankton*, Moscow, 2003, 157 p.
- 8 To freshwater algae of the USSR, 1–14, Moscow–Leningrad, 1951–1986.
- 9 Carenko P.M. *A short guide to chlorococci algae of Ukrainian SSR*, Kiev, 1990, 207 p.
- 10 Belyakov R.N., Voloshko L.N., Gavrilova O. et al. *The algae that cause «bloom» waters north-west Russia*, Moscow, 2006, 367 p.
- 11 Komarek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokaryota. 2nd Part: Oscillatoriales*, Munchen: Elsevier GmbH, 2005, 760 p.
- 12 *Guidelines for the collection and processing of materials for hydro-biological research on freshwater: Phytoplankton and its products*, Ed. G.G. Winberg, Leningrad, 1984, 31 p.
- 13 Bryantseva Yu., Lyakh A.M., Sergeeva A.V. *Calculation of volumes and surface areas of the single-celled algae of the Black Sea*, Sevastopol, 2005, p. 25.
- 14 *Guidelines for sanitary control over the content of radioactive substances in the environment*, Ed. A.N.Marey, A.S.Zykova, Moscow: USSR Ministry of Health, 1980, 36 p.
- 15 Duchovnaya N.I., Osipov D.I., Tryapitsyna G.A., Pryahin E.A., Stukalov P.M. *Problems of radiation safety*, 2011, s2, p. 24–36.
- 16 Barinova S.S., Medvedev L.A., Anisimov O.V. *Biodiversity algae-environmental indicators*, Tel Aviv: PiliesStudio, 2006, 498 p.
- 17 Fleeger J.W., Carman K.R., Nisbet R.M. *Sci. Total Environ.*, 2003, 317, p. 207–233.
- 18 *UNSCEAR Report to the General Assembly. Sources and effects of ionizing radiation*, United nations, New York, 1996.
- 19 Polikarpov G.G. *Radioecology of Aquatic Organisms*, New York: Reinhold, 1966.
- 20 Franz E.H., Woodwell G.M. *Radiat. Bot.*, 1973, 13, p. 323–329.
- 21 Wilson R.C., Vives i Batlle J., Watts S.J., McDonald P., Jones S.R., Craze A. *Radiat. Environ. Biophys.*, 2010, 49, p. 87–95.
- 22 Balushkina E.V., Golubkov S.M., Golubkov M.S., Litvinchuk L.F., Shadrin N.V. *Zh. Obshch. Biol.*, 2009, 70(6), p. 504–14.
- 23 Alcocer J., Hammer U.T. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 1998, 1(3–4), p. 291–315.
- 24 Medina-Junior P.B., Rietzler A.C. *Braz. J. Biol.*, 2005, 65(4), p. 651–659.
- 25 Salm C.R., Saros J.E., Martin C.S., Erickson J.M. *Saline Systems*, 2009, 5, p. 1.
- 26 Walker K.F. *Limnology and Oceanography*, 1975, 20(1), p. 40–53.
- 27 Khan T.A. *Limnologica — Ecology and Management of Inland Waters*, 2003, 33, p. 316–339.
- 28 Mitrofanova E.Yu. *Bulletin of the Altai State Agrarian University*, 2010, 68, p. 67–72.
- 29 Camargo J.A., Alonso A. *Environ. Int.*, 2006, 32(6), p. 831–849.
- 30 Tryapitsyna G.A., Tarasova S.P., Dukhovnaya N.I., Osipov D.I., Pryakhin E.A. *Radiation Biology. Radioecology*, 2012, 52(3), p. 298–304.
- 31 Soprunova O.B. *Problems and prospects of rehabilitation of man-made ecosystems: Int. Conf. Proc.*, Astrakhan, 2005, p. 33–38.
- 32 Pryakhin E.A., Tryapitsyna G.A., Atamanyuk N.I., Osipov D.I., Ivanov I.A., Popova I.Ya., Akleev A.V. *Radiation biology. Radioecology*, 2012, 52(4), p. 419–427.

О.Н.Зарипова¹, А.Л.Бурмистрова¹, М.С.Чернова¹, Т.А.Суслова^{1,2}, С.В.Тимофеева^{1,2}

¹Челябинский государственный университет;

²Челябинская областная станция переливания крови, Россия
(E-mail: don@csu.ru)

Взаимосвязь малой народности нагайбаков с некоторыми мировыми популяциями в дендрограмме генов системы HLA II класса

Впервые приведен анализ распределения генов HLA II класса в популяции нагайбаков. Представленная работа является фрагментом научного исследования «Генетический полиморфизм популяций Челябинской области», поддержанного Министерством образования и науки РФ в 2011–2012 гг. Показано, что исследование иммуногенетики редких и малочисленных этнических групп, в частности нагайбаков, значимо для дальнейшего изучения таких научных направлений, как «HLA и болезни», «Этногеномика», «Экологическая генетика», «Фармакогенетика», «HLA и репродукция» и для решения практических вопросов трансплантологии.

Ключевые слова: нагайбаки, тюркская этническая группа, этногенез, гены системы HLA, геногеография, гаплотипы, дендрограмма, полиморфизм, локусы (DRB1, DQA1, DQB1), метод молекулярного типирования, ДНК-технология.

Введение

Исследование посвящено изучению HLA разнообразия малой народности нагайбаков, проживающих в Челябинской области.

Нагайбаки являются тюркской этнической группой, близкой татарам-кряшанам, проживающей главным образом в Нагайбакском районе Челябинской области. По данным переписи населения РФ, в 2002 г. в Челябинской области их численность была около 9000 человек, а уже в 2012 г. — около 7000 человек, что составляет 91 % от всех нагайбаков.

Существует несколько теорий возникновения нагайбаков как отдельной народности, наибольшее количество авторов придерживается трех из них. Первая — что они являются потомками основного населения Ногайской Орды [1]. Другая версия говорит, что нагайбаки произошли от «арских татар», в число которых вошло несколько сот ногайских воинов — охранников Сеюмбеки — жены Казанского хана Жангарея [2]. Третья теория определяет нагайбаков как татаризированных потомков финно-угорских народов.

Популяция нагайбаков с точки зрения генетической структуры исследуется впервые и является уникальным материалом для популяционных исследований, как генетически молодая и относительно географически изолированная популяция.

Этногенез популяций в мировой литературе в основном оценивается характером изменчивости мтДНК и Y-хромосомы, в результате чего определяется доля участия той или иной группы народов в происхождении популяции. Однако это направление исследований отражает односторонний подход (либо материнская, либо отцовская линия) к вопросам формирования популяций и закрепления в них тех или иных предковых генов.

Гены системы HLA способны выступать в качестве свидетелей влияния на развитие популяции как отцовской, так и материнской линий, формируют общую картину происхождения, и, более того, в них «закопана» информация о предковых миграциях, геногеографии и эволюции селекции устойчивости к инфекционным заболеваниям различных популяций. В настоящее время данные гены активно используются для характеристики многих мировых популяций и выявления родственных связей между ними. Накопленные результаты исследований позволяют на основе генов системы HLA популяции делать предположения о происхождении той или иной этнической группы.

Цель работы — установить взаимосвязь малой народности нагайбаков, проживающих в Челябинской области, с некоторыми мировыми популяциями в дендрограмме генов HLA II класса и рассчитать генетические дистанции между ними.

Задачи — изучить особенности распределения генов и гаплотипов системы HLA II класса в популяции нагайбаков, определить положение малого народа нагайбаков в дендрограмме генов HLA II класса некоторых мировых популяций.

Материалы и методы

Впервые проведено генотипирование HLA II класса 112 неродственных индивидуумов, проживающих в Нагайбакском районе Челябинской области, относящих себя к малой народности — нагайбакам и знающих родной язык. Все они являются кадровыми донорами ОГУП «ЧОСПК».

Принадлежность к этнической группе определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения (согласно рекомендациям 8-го Международного Симпозиума в 1980 г., Лос-Анджелес, США).

Исследование полиморфизма генов HLA II класса (локусов DRB1, DQA1, DQB1) проводилось методом молекулярного типирования — PCR SSP наборами НПФ «ДНК-технология».

Проведена статистическая обработка полученных результатов при помощи программы Arlequin 3.1. Сделан расчет генетических дистанций между нагайбаками и другими европеоидными и монголоидными популяциями Европы и Азии и построена генетическая дендрограмма с помощью программы для построения филогенетических деревьев PHYLIP 3.68.

Обсуждение результатов

В результате оценки распределения аллелей обнаружено 24 гаплотипа DRB1-DQA1-DQB1 (табл.), среди которых в трех случаях встречается рекомбинантный гаплотип DRB1*07-DQA1*0301-DQB1*0301 (1,3 %), ранее не выявленный ни в одной из исследованных мировых популяций.

Т а б л и ц а

Распределения трехлокусных гаплотипов в популяции нагайбаков по генам системы HLA II класса

	Гаплотипы нагайбаков			Частота
1	DRB1*04	DQA1*0301	DQB1*0401/02	0,009
2	DRB1*07	DQA1*0201	DQB1*0201	0,147
3	DRB1*09	DQA1*0301	DQB1*0303	0,049
4	DRB1*04	DQA1*0301	DQB1*0302	0,058
5	DRB1*03	DQA1*0501	DQB1*0201	0,103
6	DRB1*01	DQA1*0101	DQB1*0501	0,174
7	DRB1*13	DQA1*0102	DQB1*0602–08	0,013
8	DRB1*10	DQA1*0101	DQB1*0501	0,022
9	DRB1*13	DQA1*0103	DQB1*0602–08	0,04
10	DRB1*14	DQA1*0101	DQB1*0502/04	0,009
11	DRB1*04	DQA1*0301	DQB1*0301	0,031
12	DRB1*15	DQA1*0102	DQB1*0602–08	0,045
13	DRB1*13	DQA1*0501	DQB1*0301	0,04
14	DRB1*11	DQA1*0501	DQB1*0301	0,085
15	DRB1*12	DQA1*0501	DQB1*0301	0,04
16	DRB1*16	DQA1*0102	DQB1*0502/04	0,022
17	DRB1*15	DQA1*0103	DQB1*0601	0,031
18	DRB1*07	DQA1*0201	DQB1*0303	0,013
19	DRB1*01	DQA1*0102	DQB1*0502/04	0,004
20	DRB1*08	DQA1*0501	DQB1*0301	0,013
21	DRB1*07	DQA1*0301	DQB1*0301	0,013
22	DRB1*08	DQA1*0401	DQB1*0401/02	0,022
23	DRB1*08	DQA1*0103	DQB1*0601	0,004
24	DRB1*14	DQA1*0101	DQB1*0503	0,009

В популяции нагайбаков преобладают гаплотипы DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 (14,7 %, характерный для европеоидных популяций), DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 (10,3 % — частота встречаемости, характерная для популяций смешанного типа), DRB1*01-DQA1*0101-DQB1*0501 (17,4 %), DRB1*11-DQA1*0501-DQB1*0301 (8,5 % — частота встречаемости данного гаплотипа выше у европеоидных популяций, а у монголоидных — ниже), низкие частоты характерны для гаплотипов DRB1*08-DQA1*0401-DQB1*0401/02, DRB1*10-DQA1*0101-DQB1*0501, DRB1*16-DQA1*0102-DQB1*0502/4 и др.

Полученные результаты свидетельствуют:

- о большом иммуногенетическом разнообразии популяции, несмотря на относительную культурную и географическую изоляцию;
- о присутствии в генотипе нагайбаков черт монголоидных и европеоидных популяций.

Впервые было проведено сопоставление распределения митотипов мтДНК и генов иммунного ответа HLA-DRB1 в каждой из популяций, характеризующихся доминированием европеоидных и монголоидных генов, проживающих в различных странах мирового пространства, включая данные о генетических особенностях популяций Челябинской области: русских, башкир и татар. При выполнении данной работы, на основе анализа литературных источников [3–8] и результатов наших работ [8, 10], были построены две дендрограммы некоторых мировых популяций — дендрограмма мтДНК (рис. 1) и дендрограмма генов HLA-DRB1 (рис. 2).

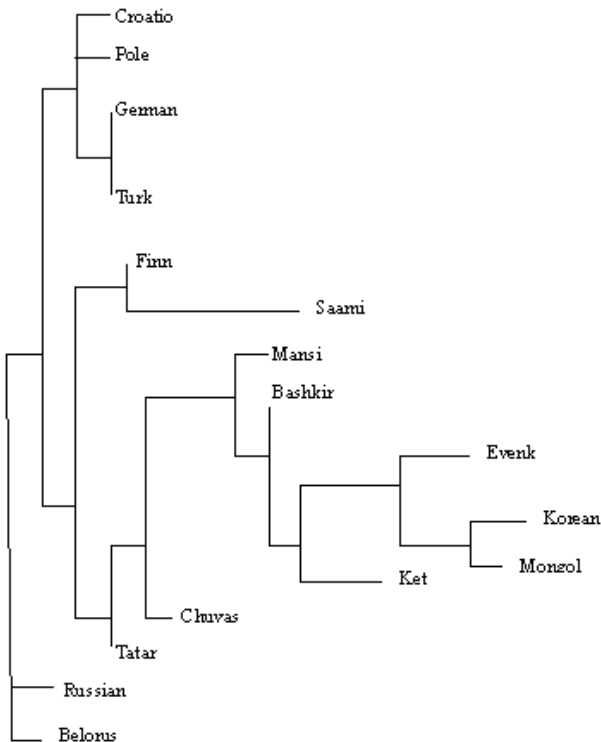


Рисунок 1. Генетическая дендрограмма некоторых мировых популяций, построенная на основе митотипов мтДНК [5, 7, 9, 11, 12]

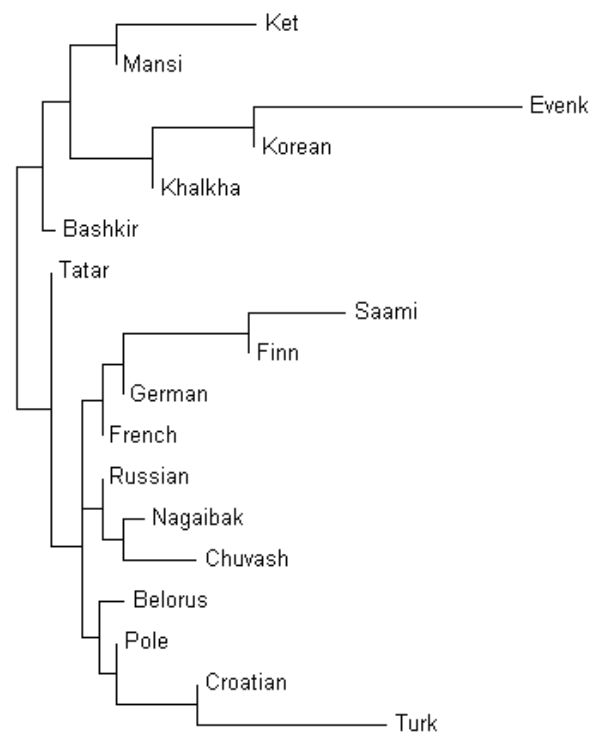


Рисунок 2. Место нагайбаков в дендрограмме генов HLA-DRB1 мировых популяций [3, 8, 10]

Для построения дендрограммы мтДНК были взяты литературные данные частот митотипов мтДНК [5, 7, 9, 11, 12]. В данной дендрограмме выделяются монголоидный и европеоидный кластеры. В монголоидный кластер вошли корейцы, монголы, эвенки, кеты, манси, башкиры и чуваш; в европеоидный — турки, хорваты, немцы, поляки, белорусы и русские; промежуточное положение заняли татары, финны и саамы.

На дендрограмме HLA-DRB1 (рис. 2) финны и саамы разбивают кластер монголоидных популяций на 2 группы: типичные монголоиды (эвенки, корейцы, монголы) и популяции, в образовании которых большую роль сыграли популяции не монголоидного происхождения, — турки, белорусы, поляки, хорваты, русские, чуваш, в т.ч. популяция нагайбаков.

На обеих дендрограммах присутствуют несколько кластеров, объединенных близким происхождением популяций. В первой дендрограмме (рис. 1) кластеры более выражены и среди них можно выделить три группы: 1 группа образована финно-угорской семьей — финны, саамы и хорваты; 2 группа — представители монголоидного происхождения (монголы, корейцы, эвенки, кеты), угорской языковой семьи (манси) и тюркской ветви алтайской языковой семьи (башкиры, чуваш, татары); 3 группа — типичные представители европеоидной расы, русские, представители восточнославянской ветви индоевропейской языковой семьи (немцы, поляки, русские, белорусы, турки).

Во второй дендрограмме по генам HLA-DRB1 (рис. 2) хорошо выражен 1 кластер представителей монголоидного происхождения, в который также вошли манси, башкиры и татары (последние имеют промежуточное положение); второй кластер разбит на 3 подгруппы по географическому признаку — европейскую (саамы, финны, немцы, французы), восточноевропейскую (белорусы, поляки, хорваты и турки) и популяции, проживающие на территории России (русские, чувашаи и нагайбаки), что, скорее всего, отражает адаптацию популяций к местам обитания.

Возможно, различия в топологии двух дендрограмм определяются также различием генетических систем, на основе которых они построены (мтДНК отражает историю материнской линии этногенеза популяции, в то время как гены HLA характеризуют совокупное влияние отцовской и материнской линий на формирование генофонда популяции).

Место нагайбаков в генофонде популяций по HLA-DRB1 подтверждает исторические данные о вкладе в их формирование различных групп народностей финно-угорского, тюркского и другого происхождения.

Расположение популяций в дендрограммах (рис. 1, 2) и по митотипам мтДНК, и по генам HLA-DRB1 сопоставимо с литературными данными мировых источников, где оценивается место различных популяций в мировом генофонде [3–7, 9–12].

Выводы

1. Популяция нагайбаков по своему иммуногенетическому профилю достаточно разнообразна, несмотря на географическую и сословную изоляцию, и включает 24 трехлокусных гаплотипа по генам системы HLA II класса.

2. Распределение частот гаплотипов генов системы HLA II класса свидетельствует о том, что в генотипе нагайбаков присутствуют черты и монголоидных, и европеоидных популяций.

3. Расположение нагайбаков в дендрограмме мировых популяций по генам HLA-DRB1 приближает их к популяциям немонголоидного происхождения.

Список литературы

- 1 Тюркологический сборник. 2003–2004: Тюркские народы в древности и средневековье. — М.: Вост. лит., 2005. — С. 273–311.
- 2 Глухов М.С. Судьба гвардейцев Сеюмбеки: Неформальный подход к еще неписанным страницам истории. — Казань: Ватан, 1993. — 285 с.
- 3 Болдырева М.Н. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. III. Народы Евразии // Иммунология. — 2006. — № 6. — С. 324–329.
- 4 Arnaiz-Villena A., Gomez-Casado E., Martinez-Laso J. Population genetic relationships between Mediterranean populations determined by HLA allele distribution and a historic perspective // Tissue Antigens. — 2002. — Vol. 60. — P. 111–121.
- 5 Bermisheva M.A., Tambets K., Villems R. et al. Diversity of Mitochondrial DNA Haplogroups in Ethnic Populations of the Volga-Ural Region // Molecular Biology. — 2002. — Vol. 36, No. 6. — P. 802–812.
- 6 Nowak J. Mika-Witkowska R., Polak M. et al. Lange Allele and extended haplotype polymorphism of HLA-A, -C, -B, -DRB1 and -DQB1 loci in Polish population and genetic affinities to other populations // Tissue Antigens. — 2008. — Vol. 71. — P. 193–205.
- 7 Derenko M.V., Lunkina A.V., Malyarchuk B.A. et al. Restriction Polymorphism of Mitochondrial DNA in Koreans and Mongolians // Russian Journal of Genetics. — 2004. — Vol. 40, No. 11. — P. 1292–1299. (Translated from Genetika. — 2004. — Vol. 40, No. 11. — P. 1562–1570.)
- 8 The Allele Frequency Net Database. URL: <http://www.allelefrequencies.net>
- 9 Конюхова Е.В., Нгуен Фьонг Нга, Климова Ф.К. и др. Разнообразие митохондриального генофонда в популяции поволжских татар республики Татарстан // Ученые записки Казанского гос. ун-та. Сер. Естеств. науки. — 2010. — Т. 152, кн. 2. — С. 128–136.
- 10 Суслова Т.А., Бурмистрова А.Л., Чернова М.С. Распределение генов, гаплотипов HLA в популяции башкир, проживающих в Челябинской области // Иммунология. — М., 2011. — № 2. — С. 65–68.
- 11 Хуснутдинова Э.К., Кутуев И.А., Хусаинова Р.И. и др. Этногенетика и филогенетические взаимоотношения народов Евразии // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10, № 1. — С. 24–40.
- 12 Pliss L., Tambets K., Loogv E.-L. et al. Mitochondrial DNA Portrait of Latvians: Towards the Understanding of the Genetic Structure of Baltic-Speaking Populations // Annals of Human Genetics. — 2006. — Vol. 70. — P. 439–458.

О.Н.Зарипова, А.Л.Бурмистрова, М.С.Чернова, Т.А.Суслова, С.В.Тимофеева

HLA II класс жүйесіндегі гендердің дендрограммасында нагайбактар шағын халқының кейбір әлемдік популяциялармен өзара байланысы

Нагайбактардың популяциясында HLA II класс гендердің үлестіруіне алғаш рет талдау жасалған. Ұсынылып отырған мақала 2011–2012 жылдары РФ Ғылым және білім министрлігінің қолдауымен жазылған «Челябі облысындағы популяцияның генетикалық полиморфизмі» атты ғылыми зерттеудің үзіндісі болып табылады. Сирек кездесетін және шағын этникалық топтардың, әсіресе нагайбактардың иммуногенетикасын зерттеу болашақта «HLA и болезни», «Этногеномика», «Экологическая генетика», «Фармакогенетика», «HLA и репродукция» сияқты ғылыми бағыттарды зерттеуге және трансплантологияның практикалық мәселелерін шешуге маңызы зор.

O.N.Zaripova, A.L.Burmistrova, M.S.Chernova, T.A.Suslova, S.V.Timofeyeva

The relationship Nagaibaks small nation with some of the world population in the dendrogram of genes HLA II class

At the first time the analysis of the HLA-II gene's distribution in the nagaibak population. This research in a part of scientific on the «Genetic polymorphism of populations of Chelabinsk region». The study of rare and Immunogenetics of minority ethnic groups, in particular Nagaibaks, significant for the further study of such scientific areas as «HLA and Disease», «Ethnogenomics», «Ecological Genetics», «Pharmacogenetics», «HLA and reproduction» and to solve practical problems transplantation.

References

- 1 *Turkological Collection. 2003–2004: The Turkic peoples in ancient and medieval times*, Moscow: Oriental Literature, 2005, p. 273–311.
- 2 Gluhov M.S. *Deaf, MS fate of the guards Seyumbeki: informal approach to even the unwritten pages of history*, Kazan: Vatan, 1993, 285 p.
- 3 Boldyrev M.N. *Immunology*, 2006, 6, p. 324–329.
- 4 Arnaiz-Villena A., Gomez-Casado E., Martinez-Laso J. *Tissue Antigens*, 2002, 60, p. 111–121.
- 5 Bermisheva M.A., Tambets K., VILLEMS R. et al. *Molecular Biology*, 2002, 36(6), p. 802–812.
- 6 Nowak J., Mika-Witkowska R., Polak M. et al. *Tissue Antigens*, 2008, 71, p. 193–205.
- 7 Derenko M.V., Lunkina A.V., Malyarchuk B.A. et al. *Russian Journal of Genetics*, 2004, 40(11), p. 1292–1299. Translated from *Genetika*, 2004, 40(11), p. 1562–1570.
- 8 *The Allele Frequency Net Database*, URL: <http://www.allelefrequencies.net>.
- 9 Konyukhova E.V., Nguyen Phuong Nga, Klimova F.K. et al. *Proceedings of the Kazan State University. Ser. Estestv. Nauki*, 2010, 152, 2, p. 128–136.
- 10 Suslova T.A., Burmistrova A.L., Chernova M.S. *Immunology*, Moscow, 2011, 2, p. 65–68.
- 11 Khusnutdinova E.K., Kutuev I.A., Khusainova R.I. et al. *Herald VOGiS*, 2006, 10(1), p. 24–40.
- 12 Pliss L., Tambets K., Loogv E.-L. et al. *Annals of Human Genetics*, 2006, 70, p. 439–458.

Д.Ю.Нохрин

*Челябинский государственный университет, Россия
(E-mail: nokhrin8@mail.ru)*

Источники изменчивости и видовые особенности микроэлементного состава рыб из минерализованного водоема

Автором изучен химический состав костной и мышечной тканей у плотвы и окуня из минерализованного озера Челябинской области. Отмечено, что в ходе многомерного оптимального шкалирования полученных данных методом нелинейного анализа главных компонент (nonlinear Principal Component Analysis) по алгоритму CATPCA выявлены особенности видовой и тканевой специфики накопления металлов, а также паттерн наиболее вероятных ксенобиотиков: природные Ni, Co, Cr и техногенные Pb и Cd.

Ключевые слова: рыбы, паттерн, химическое загрязнение, геохимический фон, минерализация воды, концентрации металлов, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Cd, Pb, ПДК, биоматериал, атомно-абсорбционный спектрофотометр.

Несмотря на обилие фактического материала, перспектива выработки цельного и структурированного взгляда на характер изменений микроэлементного состава тканей рыб весьма неопределённая. Отчасти это связано с многочисленностью и сложным характером взаимодействия факторов, влияющих на поведение эссенциальных и ксенобиотических микроэлементов в организме. Применительно к рыбам к таким факторам относят: концентрацию металла в среде и пище, размер и темпы роста, физиологическое состояние, предпочитаемые места кормления и др. [1, 2]. Полагаем, что сложность систематизации обнаруженных закономерностей связана во многом с недостаточной разработанностью методологий, позволяющих выявлять из всего многообразия связей интересующие паттерны конкретных форм изменчивости: видовой, географической, возрастной, половой, индивидуальной. В предыдущих работах [3, 4] нами было показано, каким образом многомерная техника оптимального шкалирования помогает находить ассоциации элементов, связанные с географической и видовой изменчивостью. Цель данной работы заключалась в выявлении видовой и тканевой специфики содержания металлов в рыбе минерализованного водоёма и выделении паттерна наиболее вероятных элементов-ксенобиотиков по результатам оптимального шкалирования.

Материал и методы

Отбор проб биоматериала (10 экз. плотвы и 10 экз. окуня) проводили в сентябре 2012 г. на оз. Чебакуль (Челябинская обл., Россия, координаты: 55°39' с.ш., 61°25' в.д.). Это — крупный водоём с площадью озёрного зеркала 19,8 км² и объёмом около 97 млн м³. С 1989 г. озеро относится к памятникам природы областного значения в категории «гидрологический»: озеро ценно своими бальнеологическими свойствами. Оно находится в окружении пресноводных озёр, но имеет высокую минерализацию: в 2012 г. её величина составила в среднем 4171 мг/дм³. По классификации О.А.Алекина, вода оз. Чебакуль относится к хлоридному классу, группе натрия, хлоридно-магниевому типу Ша. Техногенное загрязнение водоёма минимально, однако высокий геохимический фон, обусловленный минерализацией воды, проявляется в виде повышенных концентраций металлов в воде: из 10 изученных нами в 2012 г. металлов (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Cd, Pb) превышения ПДК_{вр} были зарегистрированы по всем элементам, кроме Fe и Cr.

Пробоподготовка биоматериала (мышечная и костная ткань рыб) велась методом сухой минерализации [5], анализ — на атомно-абсорбционном спектрофотометре «AAS-1» («Carl Zeiss Jena», Германия; аналитик — доктор ветеринарных наук Ю.Г.Грибовский).

Сравнение средних концентраций металлов в рыбе двух видов проводили с использованием *U*-критерия Манна-Уитни, поиск связей между показателями — с помощью корреляционного анализа по Спирмену. 95 %-ные доверительные интервалы для средних значений (95 % ДИ) рассчитывали с помощью процедуры бутстрепа ($n = 9999$). Расчёты выполнены в пакете PAST (v. 2.17c; [6]).

Для выявления наиболее общих закономерностей содержания металлов в тканях рыб данные подвергали процедуре многомерного оптимального шкалирования по алгоритму CATPCA (Categori-

cal Principal Component Analysis), реализованной в пакете SPSS for Windows (v. 15.0., SPSS Inc.) и позволяющей задействовать в анализе главных компонент (АГК) одновременно количественные и качественные показатели [7]. При этом концентрации металлов обрабатывали как количественные переменные с последующим ранжированием, а метки видовой и тканевой принадлежности — как номинальные категории. При выборе числа латентных переменных в анализе руководствовались критериями Кайзера и «сломанного стержня» («broken stick») [8], а для упрощения полученного решения использовали вращение «варимакс» по технологии, описанной в [9]. Графические построения выполнены в пакете KyPlot (v. 2.0 beta 15; [10]).

Во всех случаях результаты признавали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми — при $p > 0,10$; в промежуточных случаях ($0,05 < p \leq 0,10$) обсуждали тенденции к различиям.

Результаты и их обсуждение

1. Сравнение видов

В таблице 1 представлены результаты сравнения плотвы и окуня по содержанию 9 элементов в тканях, которое было проведено в целях обнаружения видовой специфики накопления металлов.

Таблица 1

Среднее содержание металлов (95 % ДИ) в тканях рыб оз. Чебакуль в 2012 г, мг/кг сух. вещ-ва

Элемент	Мышечная ткань			Костная ткань		
	Плотва (n = 10)	Окунь (n = 10)	U-критерий; p	Плотва (n = 10)	Окунь (n = 10)	U-критерий; p
Cr	3,1 (1,5–4,1)	4,8 (3,8–5,5)	10; 0,001	10,7 (3,5–15,7)	15,9 (5,5–22,1)	27,5; 0,093
Mn	0,46 (0,34–0,57)	0,97 (0,78–1,2)	10; 0,001	7,9 (0,82–13,0)	5,4 (0,56–8,3)	50; >0,999
Fe	9,7 (7,6–11,6)	10,6 (8,1–13,0)	45,5; 0,756	28,2 (21,9–34,1)	39,3 (18,1–53,0)	41; 0,516
Co	2,5 (0,49–3,8)	3,5 (2,4–4,4)	22; 0,035	9,9 (3,6–14,3)	13,5 (4,1–19,5)	35,5; 0,289
Ni	0,64 (0,25–0,99)	0,45 (0,36–0,51)	40; 0,465	1,0 (0,32–1,5)	1,5 (0,51–2,1)	27,5; 0,093
Cu	0,74 (0,62–0,85)	0,91 (0,70–1,1)	37; 0,342	3,5 (0,95–5,1)	4,4 (0,95–6,4)	37; 0,353
Zn	29,6 (23,7–34,8)	33,3 (21,1–42,9)	50; >0,999	86,2 (70,7–99,4)	70,0 (31,9–95,4)	21; 0,029
Cd	0,74 (0,27–1,0)	0,73 (0,60–0,85)	32,5; 0,195	1,8 (0,56–2,8)	2,7 (0,77–3,8)	33; 0,210
Pb	1,0 (0,54–1,4)	1,7 (1,3–2,1)	18; 0,014	3,2 (0,82–4,8)	6,4 (1,1–9,3)	19; 0,019

Примечание. Жирным шрифтом выделены различия при $p < 0,10$.

Для обоих видов было характерно концентрирование всех изученных элементов в костной ткани (на рис. 1 отношение более 1).

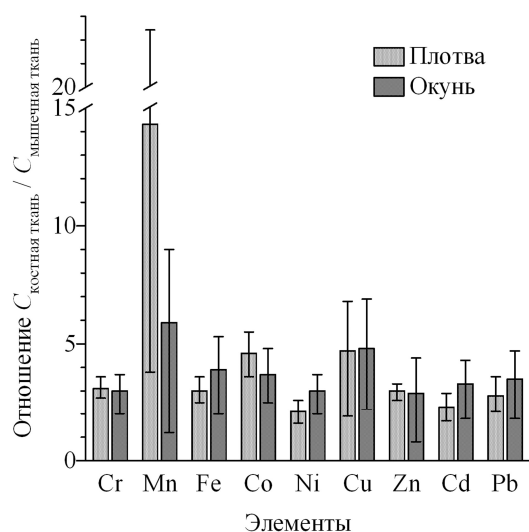


Рисунок 1. Тканевая специфика содержания металлов в рыбе оз. Чебакуль (усы — 95 %-ные доверительные интервалы)

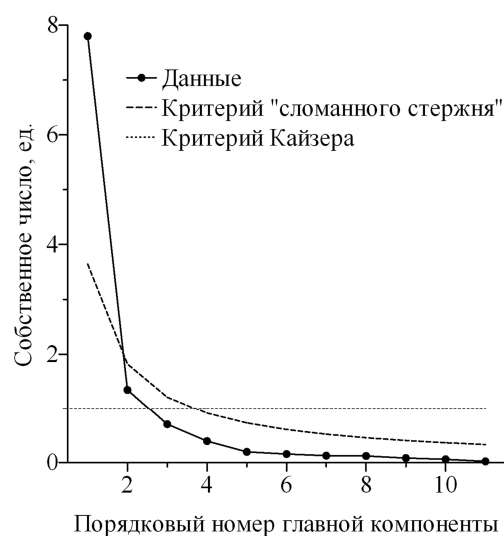


Рисунок 2. График «осыпи Кэттелла» для главных компонент, выделенных в ходе оптимального шкалирования

У окуня в мышечной ткани была обнаружена более высокая концентрация Cr, Mn, Co, Pb, а в костной — Pb и, вероятно, Cr и Ni, для которых различия были близки к статистически значимым. У плотвы наблюдалось только более высокое содержание Zn в костной ткани. Таким образом, общей для обеих тканей особенностью было более высокое накопление окунем Pb и Cr. Известно, что свинец является типичным ксенобиотиком [11], поэтому вполне закономерно, что хищный вид накапливает его в больших количествах. Хром является микроэлементом, для которого у рыб существуют регуляторные механизмы поступления в организм [12]. Обычно он не накапливается, а, напротив, его становится меньше в цепях питания в водоемах, и хищные виды рыб содержат его в меньших концентрациях [13]. Учитывая невысокие концентрации Cr в воде (<0,003 мг/дм³) и донных отложениях (<5 мг/кг сух. вещ-ва) оз. Чебакуль, причины его повышенного содержания у окуня остаются неизвестными.

2. Выявление элементов-ксенобиотиков в ходе оптимального шкалирования

Ранее нами был предложен подход, позволяющий выявлять элементы-ксенобиотики с помощью многомерных ординационных техник типа оптимального шкалирования и анализа избыточности [4]. Суть его заключается в том, что совместный анализ данных, содержащих как концентрации микроэлементов, так и метки потенциальных источников их изменчивости (видовые, тканевые, возрастные различия и т.п.), позволяет специфически «связать» первый набор со вторым. При этом появляется возможность интерпретации как паттернов элементов, задаваемых метками инструментальных переменных, так и остаточной изменчивости, представляющей собой неупорядоченный «шум» концентраций элементов-ксенобиотиков. В попытке выявить вероятные ксенобиотики эта техника была применена к данным по рыбам оз. Чебакуль.

Как видно из рисунка 2, критерий «сломанного стержня» указывал на необходимость выделения одного источника нетривиальной изменчивости, а критерий Кайзера — двух. Однако для решения задачи выделения паттерна ксенобиотиков необходимо, чтобы число латентных переменных, по меньшей мере, на единицу превосходило число инструментальных переменных (виды, ткани). Поэтому в окончательном варианте анализа были оставлены 3 главные компоненты, объясняющие в сумме 89,6 % всей наблюдаемой изменчивости (дисперсии) концентраций элементов.

Т а б л и ц а 2

Факторные нагрузки показателей на нелинейные главные компоненты при совместном анализе видов рыб

Показатели	Главные компоненты		
	ГК 1	ГК 2	ГК 3
Индикаторные переменные			
Вид (плотва — окунь)	-0,003	0,155	0,964
Ткань (мышечная — костная)	0,923	0,241	-0,029
Элементы			
Cr	0,606	0,738	0,251
Mn	0,726	0,570	0,125
Fe	0,847	0,385	0,012
Co	0,637	0,690	0,119
Ni	0,291	0,908	-0,057
Cu	0,839	0,396	0,122
Zn	0,666	0,472	-0,336
Cd	0,371	0,857	0,156
Pb	0,458	0,766	0,353
Доля объясняемой дисперсии, %	40,4	37,3	11,9

Примечание. Жирным шрифтом выделены нагрузки >0,25.

Как видно из таблицы 2, первая главная компонента (ГК 1), объясняющая 40,4 % микроэлементной изменчивости, была сформирована тканевыми различиями. На неё дали высокие положительные нагрузки все 9 элементов, что указывает на рост концентрации всех металлов в направлении от мышечной ткани к костной. Элементами, по которым у обоих видов тканевые различия проявились максимально, были Fe, Cu и Mn, минимально — Cd и Ni. Следует подчеркнуть, что это положение лишь отчасти согласуется с данными таблицы 1 и рисунка 1. Так, по степени концентрирования в костной

ткани относительно мышечной (рис. 1) изученные элементы образуют следующий убывающий ряд: Fe > Cu > Mn > Zn > Co > Cr > Pb > Cd > Ni, в то время как по нагрузке на ГК 1 этот ряд выглядит иначе: Mn > Cu > Co > Fe > Pb > Cr > Zn > Cd > Ni. Причина такого несовпадения кроется в различии способов оценки тканевых различий. При обычном сравнении данные по каждому элементу анализируются отдельно от других, при этом индивидуальная изменчивость не снижает величины самих различий и проявляется только увеличением границ доверительных интервалов. В АГК все элементы анализируются совместно, при этом выделяется паттерн металлов, проявляющих сходные тканевые различия, а индивидуальная изменчивость ослабляет корреляции, что проявляется в снижении величины факторной нагрузки. Именно поэтому вариабельный Mn, по которому ткани различались в 6–14 раз, оказался лишь на третьем месте в паттерне ГК 1. Тем не менее оба рассматриваемых ряда обнаруживают больше сходства, чем различий: наибольшие тканевые различия проявляются по эссенциальным Cu, Mn, Fe, а наименьшие — по ксенобиотическим Cd и Ni. Таким образом, в целом данные по ГК 1 соответствуют данным таблицы 1 и рисунка 1, но представляют их в более обобщённом и очищенном от «шума» случайной изменчивости виде.

Видовые различия микроэлементного состава проявились в ГК 3. Она объясняла всего 11,9 % общей изменчивости, из чего можно заключить, что тканевые различия были в целом в 3,4 раза больше видовых. С положительными нагрузками в неё вошли Pb и Cr, а с отрицательными — Zn, что полностью согласуется с выводом по таблице 1 и обсуждалось выше.

Необъяснённая изменчивость вошла в ГК 2, которая лишь немного уступала по важности компоненте тканевых различий. Из нескольких наборов данных по рыбам из пресноводных водоёмов, проанализированных нами таким образом [4, 14], здесь впервые компонента остаточной изменчивости вобрала в себя все микроэлементы. Это даёт основания предположить, что в условиях повышенной минерализации воды и геохимического фона практически все микроэлементы, включая эссенциальные, ведут себя подобно ксенобиотикам, т.е. не в полной мере контролируются организмом. Тем не менее по значениям факторных нагрузок можно увидеть, что эссенциальные Fe, Cu, Zn, Mn вошли в фактор ксенобиотиков с нагрузками менее 0,5, в то время как Ni, Cd, Pb, Cr, Co — с нагрузками более 0,5. Вероятнее всего, последние 5 элементов и представляют собой собственно ксенобиотики, тем более, что в этом наборе присутствуют 2 паттерна микроэлементов, которые мы наблюдали ранее в других водоёмах.

Первый паттерн включает Ni, Co и Cr. На Урале эти элементы входят в состав широко распространённых здесь продуктов выветривания древних ультраосновных гипербазитовых массивов [15]. В водоёмы данные элементы поступают с почвенной составляющей стоков, и данный паттерн элементов неоднократно обнаруживался нами в ходе анализа почв и донных отложений на территории Челябинской области [16, 17]. Совместное присутствие Pb и Cd в водоёмах маркирует обычно продукты сжигания углеводородов и автотранспортное загрязнение [11]; данный паттерн также обнаруживался нами ранее [18, 19]. Учитывая невысокую техногенную нагрузку на оз. Чебакуль, единственным объяснением наличия данного паттерна в водоёме является местами полное затопление прибрежных территорий вместе с окружающими озеро грунтовыми автодорогами, произошедшее в последние годы в результате высокого подъёма уровня воды. Таким образом, исходя из результатов многомерного анализа, а также предшествующего опыта работы на других уральских водоёмах, наиболее вероятными источниками поступления ксенобиотиков в озеро следует признать природный геохимический фон и автотранспортное загрязнение.

Подводя итог проведённому исследованию, необходимо констатировать высокую информативность многомерного подхода к анализу данных. В ходе одного анализа на малых выборках удалось одновременно выявить те же закономерности тканевой и видовой микроэлементной специфики, что и традиционный анализ, а также выделить группу наиболее вероятных элементов-ксенобиотиков и интерпретировать пути их поступления в водоём. Это в очередной раз доказывает перспективность использования ординационных техник в экологических исследованиях для выявления различных источников микроэлементной изменчивости и разграничения паттернов элементов на преимущественно природные или техногенные.

Список литературы

- 1 Chapman P.M., Allen H.E., Godfredsen K.Z., Graggen M.N. Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals // Environ. Sci. Technol. — 1996. — № 30. — P. 448–452.

- 2 Allen-Gil S.M., Gubala C.P., Landers D.H., Lasorsa B.K., Crecelius E.A., Curtis L.R. Heavy metal accumulation in sediment and freshwater fish in U.S. Arctic lakes // *Environ. Toxicol. and Chem.* — 1997. — Vol. 16. — P. 733–741.
- 3 Сокол Э.В., Нигматулина Е.Н., Нохрин Д.Ю. Пылевая эмиссия хрома из мест складирования шлаков феррохромового производства: на примере окрестностей г. Красногорска, Челябинская область // *Сибирский экологический журнал.* — 2010. — № 6. — С. 851–863.
- 4 Нохрин Д.Ю., Грибовский Ю.Г., Давыдова Н.А. Использование необъясненной изменчивости химического состава организмов для идентификации ксенобиотиков в экологических исследованиях // *Экология.* — 2011. — № 4. — С. 369–375.
- 5 Методические указания по атомно-абсорбционным методам определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье. — М.: Гос. ком. санэпид. надзора РФ, 1992. — 27 с.
- 6 Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica.* — 2001. — № 1. — P. 9.
- 7 Van der Kooij A.J., Meulman J.J. Categorical Principal Components Analysis // *SPPS Categories 10.0 / J.J.Meulman, W.J.Heiser, and SPSS Inc. Eds.* — Chicago: SPSS Inc., 1999. — P. 103–126, 221–237.
- 8 Jackson D.A. Stopping rules in principal component analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches // *Ecology.* — 1993. — No. 8. — P. 2204–2214.
- 9 Manisera M., Van der Kooij A.J., Dusseldorp E. Identifying the component structure of satisfaction scales by nonlinear principal components analysis // *Quality technology & quantitative management.* — 2010. — № 2. — P. 97–115.
- 10 Yoshioka K. KyPlot — a user-oriented tool for statistical data analysis and visualization // *Computational Statistics.* — 2002. — No. 3. — P. 425–437.
- 11 Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. — М.: Мир, 1987. — 288 с.
- 12 Calamari D., Solbé J.F., Howells G. Report on chromium and freshwater fish // *Water quality for freshwater fish / Ed. by G.Howells.* — Singapore: Gordon and Breach Science Publishers, 1994. — P. 1–30.
- 13 Nriagu J.O., Nieboer E. Chromium in the natural and human environments. — N.-Y.: John Wiley & Sons Inc., 1988. — 571 p.
- 14 Давыдова Н.А., Нохрин Д.Ю., Грибовский Ю.Г. Металлы в рыбе реки Миасс (г. Челябинск) // *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии.* — 2012. — № 2. — С. 54–59.
- 15 Никеленозные коры выветривания Урала / Под ред. Н.В.Павлова. — М.: Наука, 1970. — 278 с.
- 16 Нохрин Д.Ю., Грибовский Ю.Г. Опыт идентификации происхождения повышенных концентраций тяжелых металлов в объектах окружающей среды (на примере почв г. Челябинска) // *Геохимическая экология и биогеохимическое изучение таксонов биосферы.* — М.: Наука, 2003. — С. 299–302.
- 17 Нохрин Д.Ю., Грибовский Ю.Г., Давыдова Н.А. Подходы к идентификации происхождения тяжелых металлов в донных отложениях и проблемы нормирования на примере двух Уральских водохранилищ ГРЭС // *Водные ресурсы.* — 2008. — № 5. — С. 1–8.
- 18 Нохрин Д.Ю., Грибовский Ю.Г., Давыдова Н.А., Торчицкий А.Н., Хасанова Г.И. Состав и качество воды крупных водохранилищ Челябинской области // *Охрана водных объектов Челябинской области. Современные технологии водопользования: Сб. тезисов обл. науч.-практ. конф. [Электронный ресурс]* — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM): зв., цв.; 12 см. — Челябинск: Мин-во по радиац. и экол. безопасности Челяб. обл., 2010. — С. 102–104.
- 19 Нохрин Д.Ю., Грибовский Ю.Г., Сокол Э.В., Давыдова Н.А., Нигматулина Е.Н. Микроэлементный состав донных отложений Магнитогорского водохранилища: методические аспекты и парагенетические ассоциации // *Сибирский экологический журнал.* — 2010. — № 4. — С. 671–680.

Д.Ю.Нохрин

Минералданған су қоймасындағы балықтардың микроэлементтік құрамының түрлілік ерекшеліктері мен өзгергіштік көзі

Челябі облысындағы минералданған көлдегі шабақ пен алабұға балықтарының сүйек және бұлшық ет тінінің химиялық құрамы зерттелді. Басты компоненттерден (nonlinear Principal Component Analysis) сызықсыз талдау әдісімен алынған мәліметтер көпөлшемді қолайлы бөлу барысында CATPCA алгоритмі бойынша металдардың қор ерекшеліктері, сонымен қатар табиғи Ni, Co, Cr және техногендік Pb и Cd жиі ұшырасатын ксенобиотиктер түрлері анықталды.

D.Yu.Nokhrin

Sources of variation and species of the features microelement from mineralized fish pond

The chemical composition of bone and muscle tissue in roach and perch from the mineralized lake of Chelyabinsk region were studied. During the multivariate optimal scaling of the data in the nonlinear Principal Component Analysis, using the algorithm CATPCA, peculiarities of species and tissue specificity of metal accumulation were shown, as well as the most likely pattern of xenobiotics: natural Ni, Co, Cr, and man-made Pb and Cd.

References

- 1 Chapman P.M., Allen H.E., Godtfredsen K.Z., Graggen M.N. *Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30, p. 448–452.
- 2 Allen-Gil S.M., Gubala C.P., Landers D.H., Lasorsa B.K., Crecelius E.A., Curtis L.R. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 1997, 16, p. 733–741.
- 3 Falcon E.V., Nigmatullin E.N., Nokhrin D.Yu. *Siberian ecological magazine*, 2010, 6, p. 851–863.
- 4 Nokhrin D.Yu., Gribovsky Yu.G., Davydova N.A. *Ecology*, 2011, 4, p. 369–375.
- 5 *Methodical instructions on nuclear and absorbing methods of definition of toxic elements in foodstuff and food raw materials*, Moscow: State. lump. sanitary station. supervision of the Russian Federation, 1992, 27 p.
- 6 Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 1, p. 9.
- 7 Van der Kooij A.J., Meulman J.J. *SPPS Categories 10.0*, Chicago: SPSS Inc., 1999, p. 103–126, 221–237.
- 8 Jackson D.A. *Ecology*, 1993, 8, p. 2204–2214.
- 9 Manisera M., Van der Kooij A.J., Dusseldorp E. *Quality technology & quantitative management*, 2010, 2, p. 97–115.
- 10 Yoshioka K. *Computational Statistics*, 2002, 3, p. 425–437.
- 11 Moore J.V., Ramamurti S. *Heavy metals in natural waters*, Moscow: Mir, 1987, 288 p.
- 12 Calamari D., Solbé J.F., Howells G. *Water quality for freshwater fish*, Singapore: Gordon and Breach Science Publishers, 1994, p. 1–30.
- 13 Nriagu J.O., Nieboer E. *Chromium in the natural and human environments*, N.-Y.: John Wiley & Sons Inc., 1988, 571 p.
- 14 Davydova N.A., Nokhrin D.Yu., Gribovsky Yu.G. *Problems of veterinary sanitation, hygiene and ecology*, 2012, 2, p. 54–59.
- 15 *Nickel-bearing weathering crust of the Urals*, Ed. by N.V.Pavlov, Moscow: Nauka, 1970, 278 p.
- 16 Nokhrin D.Yu., Gribovsky Yu.G. *Geochemical ecology and biogeochemical studying taxson of biospheres*, Moscow: Nauka, 2003. — P. 299–302.
- 17 Nokhrin D.Yu., Gribovsky Yu.G., Davydova N.A. *Water resources*, 2008, 5, p. 1–8.
- 18 Nokhrin D.Yu., Gribovsky Yu.G., Davydova N.A., Torchitsky A.N., Khasanova G.I. *Protection of water objects of Chelyabinsk region. Modern technologies of water use: Region scientific-pract. conf. Proc.*, Chelyabinsk: Ministry of radiation and ecological safety, 2010, p. 102–104.
- 19 Nokhrin D.Yu., Gribovskiy Yu.G., Sokol E.V., Davydova N.A., Nigmatulina E.N. *Siberian ecological magazine*, 2010, 4, p. 671–680.

П.В.Уржумов, Е.А.Блинова, А.В.Аклеев

Челябинский государственный университет, Россия
(E-mail: burmal@csu.ru)

Полиморфизмы генов OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 и ATM у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию

В статье отмечено, что полиморфные варианты генов, связанных с детоксикацией и поддержанием редокс-баланса организма, могут быть ассоциированы с индукцией активных радикалов и оксидативным стрессом, возникающим в ответ на облучение. Представлен анализ распределения частот генотипов и аллелей по полиморфным локусам генов OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 и ATM в группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. Также приведен анализ генотипов между группами тюркской и славянской этнической принадлежности и группами, разделенными по половому признаку.

Ключевые слова: облучение, доза, нестабильность генома, экспрессия генов, индукция, синтез белков, мутации, аберрации, хромосомы, чувствительность, радионуклиды, генотипирование, детекция, полимеразная цепная реакция.

Введение

Длительное облучение в малых и средних диапазонах доз вызывает целый ряд процессов и эффектов, которые могут не регистрироваться при облучении в высоких дозах. Могут реализовываться нестабильность генома, экспрессия генов, индукция синтеза белков, генные мутации, аберрации хромосом, повышение чувствительности к последующим воздействиям и многое другое [1–3]. Так, в лимфоцитах лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на реке Теча, в отдаленные периоды после начала радиационного воздействия наблюдалось повышение уровня соматических мутаций в гене Т-клеточного рецептора, частоты хромосомных аберраций (дицентриков, ацентрических колец, кольцевых хромосом и транслокаций), числа клеток с блоком клеточного цикла, ранней апоптотической гибели [4–6]. Кроме того, было отмечено возрастание риска развития эффектов стохастической природы, в первую очередь лейкозов, при этом время регистрации пика возникновения лейкозиев зависит, главным образом, от дозы [7].

Молекулярные механизмы реализации отдаленных последствий хронического радиационного воздействия на сегодняшний день недостаточно полно ясны. Однако накоплено множество данных, указывающих на то, что точечные мутации, частота встречаемости которых в популяции не менее 1 % (однонуклеотидные генетические полиморфизмы), в генах систем репарации ДНК, контроля клеточного цикла и апоптоза могут модифицировать ответ организма на радиационное воздействие и влиять на развитие отдаленных последствий. Полиморфизмы в гене OGG1, участвующем в эксцизионной репарации оснований, связаны с повышенным уровнем хромосомных аберраций [8] и мутаций в гене TP53 [9], а также с онкопатологией мочевого пузыря [10], желчного пузыря [11], поджелудочной железы [12], прямой кишки [13] и легких [14]. Полиморфные варианты гена ERCC2, относящегося к системе эксцизионной репарации оснований, были связаны с повышенной чувствительностью к 5-флуороурацилу в сочетании с облучением [15], с повышенным риском развития рака молочной железы у женщин, подвергавшихся низкоинтенсивному воздействию ионизирующего излучения [16], и с рядом других онкологических заболеваний [14, 17, 18]. Односайтовые замены в гене белка PARP1, который вовлечен в процесс эксцизионной репарации нуклеотидов, ассоциированы с такими эффектами, как повышенный уровень соматических мутаций в гене TP53 [9], снижение продолжительности жизни [19], а также с повышенным риском развития онкопатологий различных локализаций [20–22]. Односайтовые замены в генах системы репарации ДНК по типу негомологичного соединения концов также могут влиять на развитие отдаленных эффектов. Так, у носителей полиморфных генов XRCC4 был обнаружен повышенный риск развития рака молочной железы [23, 24]. В гене XRCC3, относящемся к системе гомологичной рекомбинации ДНК, встречаются однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные с увеличением числа хромосомных делеций и транслокаций [8], а также с онкопатологиями различных локализаций: мочевого пузыря [25], молочной железы [26], толстой кишки [27], легких [14]. Помимо систем репарации ДНК, важную роль в поддержании го-

меостаза организма играет и группа ферментов, регулирующих клеточный цикл. Например, полиморфизмы в гене АТМ связаны с повышенным риском развития радиационно-индуцированного папиллярного рака щитовидной железы [28] и с повышенным риском развития рака молочной железы [29]. Таким образом, наличие полиморфизмов, ассоциированных с неэффективной репарацией и нарушениями регуляции клеточного цикла, в сочетании с генотоксическим действием ионизирующего излучения могут стать причиной повышенной вероятности развития отдаленных последствий облучения.

Характеристика обследованных лиц

В ходе работы были обследованы 172 человека. Данную группу составили люди, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию в 1950–1960 гг. в результате загрязнения радиоактивными отходами ПО «Маяк» бассейна реки Течи [30]. Население прибрежных сел подверглось действию комбинированного внешнего (преимущественно γ -) и внутреннего γ - и β -излучения с низкой ЛПЭ. Основными источниками внешнего γ -излучения являлись: вода, донные отложения и пойменные почвы, а также участки территории населенных пунктов, загрязненные в результате хозяйственной деятельности (поливные огороды, механический перенос радиоактивности). Внутреннее облучение было обусловлено радионуклидами, поступавшими в организм с речной водой и продуктами питания местного производства (молоко, рыба, овощи с поливных огородов). Наиболее высокие уровни суммарной β -активности были обнаружены в рыбе и мясе водоплавающей птицы. Менее загрязненными смесью радионуклидов были молоко и овощи [31].

Основным дозообразующим радионуклидом был ^{90}Sr . Являясь аналогом кальция, стронций накапливался и долгое время удерживался в костной ткани. Кроме того, значимый вклад в формирование дозы внесли ^{137}Cs и ^{89}Sr , но, благодаря короткому периоду полураспада ^{89}Sr и быстрому выведению из организма ^{137}Cs , облучение за счет этих радионуклидов реализовывалось только в первые 5 лет после их поступления [19]. Все обследованные имели индивидуальную реконструированную дозу на ККМ. Средняя доза на красный костный мозг составила $0,72 \pm 0,07$ Гр. 61 процент обследованных принадлежал к тюркской этнической группе (татары и башкиры), а 39 % — к славянской (преимущественно русские). В группе присутствовали как мужчины (32 %), так и женщины (68 %). Характеристика группы представлена в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Характеристика исследуемой группы

Пол	Этническая принадлежность						Средняя доза на ККМ, сГр
	Славяне		Тюрки		Все		
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Мужской	19	35	36	65	55	32	82 ± 12
Женский	48	41	69	59	117	68	67 ± 8
Оба	67	39	105	61	172	100	72 ± 7

Выделение ДНК и генотипирование

В исследовании использовались замороженные образцы крови, сохраняемые в банке тканей ФБГУН УНПЦ РМ. Одна часть ДНК была выделена с помощью набора реагентов iPrep PureLink gDNA Blood Kit на приборе Applied Biosystems Library Builder, а другая — методом фенол-хлороформной экстракции ДНК, включающем ряд этапов. После размораживания 700 мкл крови переносили в пробирку эппендорф и добавляли 700 мкл 1xSSC. Центрифугировали при 12000 об./мин 2 минуты. К осадку добавляли 1400 мкл 1xSSC, перемешивали и вновь центрифугировали при 12000 об./мин 2 минуты. К осадку добавляли 270 мкл ацетатного буфера, 30 мкл 10 % SDS, инкубировали при 37 °С 1 час. Затем проводилась очистка фенол-хлороформной смесью (50/50). После центрифугирования (12000 об./мин — 10 минут) надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и осаждали ДНК 1000 мкл спирта (100 %). После кратковременного центрифугирования проводили отмывку 70 %-ным спиртом. Получившийся осадок ДНК высушивали и растворяли в 100 мкл деионизированной воды.

В исследование были включены полиморфизмы генов OGG1 (rs1052133), ERCC2 (rs13181), PARP1 (rs1136410), XRCC4 (rs2075685), XRCC3 (rs861539) и АТМ (rs664677).

Генотипирование образцов и детекция результатов осуществлялись методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе Applied Biosystems StepOnePlus с использованием наборов реагентов ФЛЭШ производства фирмы Gen-Expert (Москва).

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного комплекса SPSS Statistics 17.0. Сравнение распределения генотипов для групп, отличающихся по этническому или половому признаку, и проверку на соответствие равновесному распределению Харди-Вайнберга проводили с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

Для исследования были выбраны 6 полиморфизмов генов систем эксцизионной репарации оснований (OGG1), эксцизионной репарации нуклеотидов (ERCC2, PARP1), негомологичного соединения концов ДНК (XRCC4), гомологичной рекомбинации (XRCC3) и контроля клеточного цикла (ATM), так как, по литературным данным, генетические варианты в данных системах могут быть связаны с увеличением уровня соматических мутаций, хромосомных aberrаций и повышением вероятности развития онкопатологий [8, 32, 33]. Результаты генотипирования представлены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Распределение генотипов, частоты аллелей и отличие от равновесного распределения Харди-Вайнберга

Полиморфизм	Количество человек	Частота генотипа, %			Частота аллеля, %		MAF ² , %	Отличие от равновесного распределения, χ^2
		AA ¹	AB	BB	A	B		
OGG1 rs1052133	82	53,66	37,81	8,54	72,56	27,44	37,00	0,21
ERCC2 rs13181	82	40,24	40,24	19,51	60,37	39,63	42,50	2,07
PARP1 rs1136410	144	65,97	29,86	4,17	80,90	19,10	31,50	0,16
XRCC4 rs2075685	82	46,34	37,81	15,85	65,24	34,76	33,50	2,27
XRCC3 rs861539	163	49,08	23,92	27,00	61,04	38,96	24,50	40,28³
ATM rs664677	82	21,95	51,22	26,83	47,56	52,44	49,00	0,06

Примечание. ¹ — А — мажорный аллель, В — минорный аллель; ² — Средняя частота минорного аллеля в европейских и азиатских популяциях; ³ — $P < 0,005$.

Частоты минорных аллелей генов OGG1, PARP1 и XRCC3 достоверно отличались от соответствующих средних частот для объединенной европейско-азиатской популяции. Вариант OGG1 326Cys в исследованной группе встречался реже ($P = 0,05$), как и PARP1 742Ala ($P = 0,03$), а аллель XRCC3 241Met наблюдался значительно чаще ($P < 0,01$). Однако при этом они полностью согласовались со средними частотами для исключительно европейских популяций.

Распределение генотипов по всем исследованным локусам, кроме XRCC3 rs861539, соответствовало закону равновесного распределения Харди-Вайнберга, что может говорить об отсутствии значимых факторов отбора в отношении данных вариантов в исследованной популяции. Для XRCC3 rs861539 наблюдалось значительное снижение числа гетерозигот при равном увеличении количества гомозигот по сравнению с ожидаемым распределением ($\chi^2 = 40,28$; $P < 0,01$).

Было проведено сравнение распределения генотипов между группами тюркской и славянской этнической принадлежности, а также между группами, разделенными по половому признаку. Результаты анализа приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Сравнение распределения генотипов в зависимости от этнической и половой принадлежности

Полиморфизм	Количество человек	Различия в распределении генотипов	
		по национальности, χ^2 (P)	по полу, χ^2 (P)
OGG1 rs1052133	82	5,08 (0,17)	7,84 (0,05)
ERCC2 rs13181	82	5,37 (0,15)	2,67 (0,45)
PARP1 rs1136410	144	2,39 (0,50)	1,43 (0,70)
XRCC4 rs2075685	82	13,62 (< 0,01)	0,25 (0,97)
XRCC3 rs861539	163	1,57 (0,67)	1,314 (0,726)
ATM rs664677	82	2,70 (0,44)	0,24 (0,97)

Распределение генотипов гена XRCC4 сильно отличалось между этническими группами. У тюркитов наблюдалось 65,5 % гомозигот по мажорному аллелю, 29,2 % гетерозигот и 8,3 % гомозигот по минорному аллелю, в то время как для славян распределение составляло 23,5; 50,0 и 26,6 % соответственно. Также отмечалось различие в распределении генотипов варианта OGG1 rs1052133 между мужчинами и женщинами. Среди мужчин гомозиготы по мажорному аллелю встречались значительно чаще (76,0 %), чем среди женщин (43,9 %).

Заключение

Таким образом, результаты предварительного исследования показывают, что частоты минорных аллелей генов OGG1, PARP1 и XRCC3 достоверно отличались от соответствующих средних частот для объединенной европейско-азиатской популяции, однако при сравнении с частотами в европейской популяции различий не наблюдалось.

Распределение генотипов по всем исследованным локусам, кроме XRCC3 rs861539, соответствовало закону равновесного распределения Харди-Вайнберга, что может говорить об отсутствии значимых факторов отбора в отношении данных вариантов в исследованной популяции.

Распределение генотипов гена XRCC4 значительно отличалось между этническими группами. Также отмечалось различие в распределении генотипов варианта OGG1 rs1052133 между мужчинами и женщинами.

На данном этапе работы не представляется возможным сделать окончательные выводы о причине несоответствия распределения гена XRCC3 и различий в частоте встречаемости минорных аллелей генов OGG1, PARP1, XRCC3. В связи с этим в дальнейшем планируется продолжение исследований на расширенной группе людей.

Список литературы

- 1 Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антошина М.М., Рябченко Н.И., Семенова Л.П., Серебряный А.М. Индивидуальная вариабельность в проявлении адаптивного ответа клеток человека на воздействие ионизирующей радиации. Подходы к ее определению // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47, № 6. — С. 658–666.
- 2 Smirnov D.A., Morley M., Shin E., Spielman S., Cheung V.G. Genetic analysis of radiation-induced changes in human gene expression // Nature. — 2009. — Vol. 459, No. 28. — P. 587–591.
- 3 Limoli C.L., Ponnaiya B., Corcoran J.J., Giedzinski E., Kaplan M.I. et al. Genomic instability induced by high and low LET ionizing radiation // Adv Space Res. — 2000. — No. 25. — P. 2107–2117.
- 4 Маркина Т.Н., Веремеева Г.А., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Блок клеточного цикла и активность апоптоза лимфоцитов периферической крови (ЛПК), частота мутаций в генах TCR в отдаленные сроки у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Вопросы радиационной безопасности. — 2011. — № 1. — С. 41–49.
- 5 Veremeyeva G.A., Akushevich I.V., Ukraintseva S.V., Yashin A.I., Epifanova S.B., Blinova E.A., Akleyev A.V. A new approach to individual prognostication of cancer development under conditions of chronic radiation exposure // Int. Journal of Low Radiation. — 2010. — Vol. 7, No. 1. — P. 53–80.
- 6 Blinova E.A., Veremeyeva G.A., Akleyev A.V. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes and mutations in the gene of the T-cell receptor in survivors of chronic radiation exposure // Health Phys. — 2012. — Vol. 103, No. 1. — P. 58–60.
- 7 Krestinina L., Yu D.L., Preston E.V., Ostroumova E.V. et al. Protracted radiation exposure and cancer mortality in the Techa River Cohort // Radiat. Res. — 2005. — No. 164(5). — P. 602–611.
- 8 Минина В.И. Генетический полиморфизм и хромосомные aberrации, индуцированные радиацией // Сибирский медицинский журнал. — 2012. — № 3.
- 9 Cho S. et al. Associations between polymorphisms in DNA repair genes and TP53 mutations in non-small cell lung cancer // Lung Cancer. 2011. — Vol. 73, No. 1. — P. 25–31.
- 10 Arizono K., Osada Y., Kuroda Y. DNA repair gene hOGG1 codon 326 and XRCC1 codon 399 polymorphisms and bladder cancer risk in a Japanese population // Jpn. J. Clin. Oncol. — 2008. — Vol. 38, No. 3. — P. 186–191.
- 11 Jiao X. et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and susceptibility to gallbladder cancer in a Chinese population // Int. J. Cancer. — 2007. — Vol. 121, No. 3. — P. 501–505.
- 12 Zhang J. et al. Sequence variants in antioxidant defense and DNA repair genes, dietary antioxidants, and pancreatic cancer risk // Int. J. Mol. Epidemiol. Genet. — 2011. — Vol. 2, No. 3. — P. 236–244.
- 13 Canbay E. et al. Association of APE1 and hOGG1 polymorphisms with colorectal cancer risk in a Turkish population // Curr. Med. Res. Opin. — 2011. — Vol. 27, No. 7. — P. 1295–1302.
- 14 Hung R.J., Baragatti M., Thomas D., McKay J., Szeszenia-Dabrowska N., Zaridze D., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Foretova L., Janout V., Bencko V., Chabrier A., Moullan N., Canzian F., Hall J., Boffetta P., Brennan P. Inherited predisposition of lung cancer: a hierarchical modeling approach to DNA repair and cell cycle control pathways // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. — 2007. — Vol. 16, No. 12. — P. 2736–2744.
- 15 Duldulao M.P., Lee W., Nelson R.A., Ho J., Le M., Chen Z., Li W., Kim J., Garcia-Aguilar J. Gene polymorphisms predict toxicity to neoadjuvant therapy in patients with rectal cancer // Cancer. — 2013. — Vol. 119, No. 5. — P. 1106–1112.

- 16 Rajaraman P., Bhatti P., Doody M.M., Simon S.L., Weinstock R.M., Linet M.S., Rosenstein M., Stovall M., Alexander B.H., Preston D.L., Sigurdson A.J. Nucleotide excision repair polymorphisms may modify ionizing radiation-related breast cancer risk in US radiologic technologists // *Int. J. Cancer*. — 2008. — Vol. 123, No. 11. — P. 2713–2716.
- 17 Kiyohara C., Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis // *Int. J. Med. Sci.* — 2007. — Vol. 4, No. 2. — P. 59–71.
- 18 Mocellin S., Verdi D., Nitti D. DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis // *Carcinogenesis*. — 2009. — Vol. 30, No. 10. — P. 1735–1743.
- 19 Walston J.D. Inflammation and stress-related candidate genes, plasma interleukin-6 levels, and longevity in older adults // *Exp. Gerontol.* — 2009. — Vol. 44, No. 5. — P. 350–355.
- 20 Kim J., Pyun J.A., Cho S.W., Lee K., Kwack K. Lymph node metastasis of gastric cancer is associated with the interaction between poly (ADP-ribose) polymerase 1 and matrix metalloproteinase 2 // *DNA Cell Biol.* — 2011. — Vol. 30, No. 12. — P. 1011–1017.
- 21 Figueroa J.D. et al. Genetic variation in the base excision repair pathway and bladder cancer risk // *Hum. Genet.* — 2007. — Vol. 121, No. 2. — P. 233–242.
- 22 Smith T.R., Levine E.A., Freimanis R.I., Akman S.A., Allen G.O., Hoang K.N., Liu-Mares W., Hu J.J. Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk // *Carcinogenesis*. — 2008. — Vol. 29, No. 11. — P. 2132–2138.
- 23 Sehl M.E., Langer L.R., Papp J.C., Kwan L., Seldon J.L., Arellano G., Reiss J., Reed E.F., Dandekar S., Korin Y., Sinsheimer J.S., Zhang Z.F., Ganz P.A. Associations between single nucleotide polymorphisms in double-stranded DNA repair pathway genes and familial breast cancer // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — Vol. 15, No. 6. — P. 2192–2203.
- 24 Zhou L.P., Luan H., Dong X.H., Jin G.J., Ma D.L., Shang H. Association of functional polymorphisms of the XRCC4 gene with the risk of breast cancer: a meta-analysis // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* — 2012. — Vol. 13, No. 7. — P. 3431–3436.
- 25 Figueroa J.D., Malats N., Rothman N., Real F.X., Silverman D., Kogevinas M., Chanock S., Yeager M., Welch R., Dosemeci M., Tardón A., Serra C., Carrato A., García-Closas R., Castaño-Vinyals G., García-Closas M. Evaluation of genetic variation in the double-strand break repair pathway and bladder cancer risk // *Carcinogenesis*. — 2007. — Vol. 28, No. 8. — P. 1788–1793.
- 26 Silva S.N., Tomar M., Paulo C., Gomes B.C., Azevedo A.P., Teixeira V., Pina J.E., Rueff J., Gaspar J.F. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51. *Cancer Epidemiol.* 2010 Feb;34(1):85–92.
- 27 Krupa R., Sliwinski T., Wisniewska-Jarosinska M., Chojnacki J., Wasylecka M., Dziki L., Morawiec J., Blasiak J. Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer — a case control study // *Mol. Biol. Rep.* — 2011. — Vol. 38, No. 4. — P. 2849–2854.
- 28 Akulevich N.M., Saenko V.A., Rogounovitch T.I., Drozd V.M., Lushnikov E.F., Ivanov V.K., Mitsutake N., Kominami R., Yamashita S. Polymorphisms of DNA damage response genes in radiation-related and sporadic papillary thyroid carcinoma // *Endocr. Relat. Cancer*. — 2009. — Vol. 16, No. 2. — P. 491–503.
- 29 Zhao L., Gu A., Ji G., Zou P., Lu A. The Association between ATM IVS 22–77 T>C and Cancer Risk: A Meta-Analysis // *PLoS One*. — 2012. Vol. 7, No. 1. — P. e29479. doi:10.1371/journal.pone.2012.
- 30 Аклеев А.В. Медико-биологические и экологические последствия радиоактивного загрязнения реки Теча / Аклеев А.В., Киселев М.Ф. — М.: Медбиоэкстрем, 2000. — 532 с.
- 31 Дегтева М.О., Воробьева М.И., Толстых Е.И., Шагина Н.Б., Кожеуров В.П. Дозиметрическая система реки Теча: реконструкция доз для оценки риска радиационных последствий // *Вопросы радиационной безопасности*. — 2000. — № 4. — С. 36–46.
- 32 Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M., Shagina N.B., Shishkina E.A., Krivoshchapov V.A., Anspaugh L.R., Napier B.A. Reconstruction of long-lived radionuclide intakes for Techa riverside residents: strontium-90 // *Health Physics*. — 2011. — Vol. 101. — P. 28–47.
- 33 Сальникова Л.Е. Генетическая детерминация эффектов ионизирующих излучений: цитогенетические и эпидемиологические показатели: Дис. ... — М., 2011.

П.В.Уржумов, Е.А.Блинова, А.В.Аклеев

Созылмалы радиациялық әсерге душар болған адамдардағы OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 және ATM гендердің полиморфизмі

Ағзаның ұлану және редокс-балансымен байланысқан гендердің полиморфтық варианттары белсенді радикалдар индукциясымен ассоциацияға душар болуы мүмкін. Мақалада созылмалы радиациялық әсерге душар болған адамдардағы OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 және ATM гендердің полиморфтік локустар бойынша генотиптің және аллелдердің жиілігінің таратушылығының талдау нәтижелері көрсетілген. Сонымен қатар түркі және славян этникалық топтардың генотипі және жыныстық белгі бойынша бөлінген адамдарға зерттеу жүргізілген.

P.V.Urzhumov, E.A.Blinova, A.V.Akleyev

Polymorphisms of genes of OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 and ATM at the persons which have undergone chronic radiation influence

Polymorphic variants of genes related to detoxication and maintenance of redox homeostasis of the organism can be associated with the induction of active radicals and oxidative stress in response to radiation exposure. Presented in this article is an analysis of genotype and allele frequency distribution by polymorphic loci in OGG1, ERCC2, PARP1, XRCC4, XRCC3 и ATM genes in a group of people chronically exposed to radiation. Also, the article presents the data resulting from an analysis of gender and ethnicity dependences of the genotype frequency in the groups studied.

References

- 1 Pelevina I.I., Aleshchenko A.V., Antoshchina M.M., Ryabchenko N.I., Semenova L.P., Serebryanyy A.M. *Radiation biology. Radio ecology*, 2007, 47(6), p. 658–666.
- 2 Smirnov D.A., Morley M., Shin E., Spielman S., Cheung V.G. *Nature*, 2009, 459(28), p. 587–591.
- 3 Limoli C.L., Ponnaiya B., Corcoran J.J., Giedzinski E., Kaplan M.I. et al. *Adv Space Res.*, 2000, 25, p. 2107–2117.
- 4 Markina T.N., Veremeyeva G.A., Blinova E.A., Akleyev A.V. *Questions of radiation safety*, 2011, 1, p. 41–49.
- 5 Veremeyeva A., Akushevich I.V., Ukraintseva S.V., Yashin A.I., Epifanova S.B., Blinova E.A., Akleyev A.V. *Int. Journal of Low Radiation*, 2010, 7(1), p. 53–80.
- 6 Blinova E.A., Veremeyeva G.A., Akleyev A.V. *Health Phys.*, 2012, 103(1), p. 58–60.
- 7 Krestinina L., Yu D.L., Preston E.V., Ostroumova E.V. et al. *Radiat. Res.*, 2005, 164(5), p. 602–611.
- 8 Minina V.I. *Siberian medical magazine*, 2012, 3.
- 9 Cho S. et al. *Lung Cancer*, 2011, 73(1), p. 25–31.
- 10 Arizono K., Osada Y., Kuroda Y. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2008, 38(3), 186–191.
- 11 Jiao X. et al. *Int. J. Cancer.*, 2007, 121(3), p. 501–505.
- 12 Zhang J. et al. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.*, 2011, 2(3), p. 236–244.
- 13 Canbay E. et al. *Curr. Med. Res. Opin.*, 2011, 27(7), p. 1295–1302.
- 14 Hung R.J., Baragatti M., Thomas D., McKay J., Szeszenia-Dabrowska N., Zaridze D., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Foretova L., Janout V., Bencko V., Chabrier A., Moullan N., Canzian F., Hall J., Boffetta P., Brennan P. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007, 16(12), p. 2736–2744.
- 15 Duldulao M.P., Lee W., Nelson R.A., Ho J., Le M., Chen Z., Li W., Kim J., Garcia-Aguilar J. *Cancer*, 2013, 119(5), p. 1106–1112.
- 16 Rajaraman P., Bhatti P., Doody M.M., Simon S.L., Weinstock R.M., Linet M.S., Rosenstein M., Stovall M., Alexander B.H., Preston D.L., Sigurdson A.J. *Int. J. Cancer*, 2008, 123(11), p. 2713–2716.
- 17 Kiyohara C., Yoshimasu K. *Int. J. Med. Sci.*, 2007, 4(2), p. 59–71.
- 18 Mocellin S., Verdi D., Nitti D. *Carcinogenesis*, 2009, 30(10), p. 1735–1743.
- 19 Walston J.D. *Exp. Gerontol.*, 2009, 44(5), 350–355.
- 20 Kim J., Pyun J.A., Cho S.W., Lee K., Kwack K. *DNA Cell Biol.*, 2011, 30(12), p. 1011–1017.
- 21 Figueroa J.D. et al. *Hum. Genet.*, 2007, 121(2), 233–242.
- 22 Smith T.R., Levine E.A., Freimanis R.I., Akman S.A., Allen G.O., Hoang K.N., Liu-Mares W., Hu J.J. *Carcinogenesis*, 2008, 29(11), p. 2132–2138.
- 23 Sehl M.E., Langer L.R., Papp J.C., Kwan L., Seldon J.L., Arellano G., Reiss J., Reed E.F., Dandekar S., Korin Y., Sinsheimer J.S., Zhang Z.F., Ganz P.A. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15(6), p. 2192–2203.
- 24 Zhou L.P., Luan H., Dong X.H., Jin G.J., Ma D.L., Shang H. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2012, 13(7), p. 3431–3436.
- 25 Figueroa J.D., Malats N., Rothman N., Real F.X., Silverman D., Kogevinas M., Chanock S., Yeager M., Welch R., Dosemeci M., Tardón A., Serra C., Carrato A., García-Closas R., Castaño-Vinyals G., García-Closas M. *Carcinogenesis*, 2007, 28(8), 1788–1793.
- 26 Silva S.N., Tomar M., Paulo C., Gomes B.C., Azevedo A.P., Teixeira V., Pina J.E., Rueff J., Gaspar J.F. *Cancer Epidemiol.*, 2010, 34(1), 85–92.
- 27 Krupa R., Sliwinski T., Wisniewska-Jarosinska M., Chojnacki J., Wasylecka M., Dziki L., Morawiec J., Blasiak J. *Mol. Biol. Rep.*, 2011, 38(4), p. 2849–2854.
- 28 Akulevich N.M., Saenko V.A., Rogounovitch T.I., Drozd V.M., Lushnikov E.F., Ivanov V.K., Mitsutake N., Kominami R., Yamashita S. *Endocr. Relat. Cancer.*, 2009, 16(2), p. 491–503.
- 29 Zhao L., Gu A., Ji G., Zou P., Zhao P., Lu A. *PLoS One.*, 2012, 7(1), e29479. doi:10.1371/journal.pone.2012.
- 30 Akleyev A.V. *Medicobiological and ecological consequences of radioactive pollution of the river Techa*, Moscow: Medbioekstrem, 2000, 532 p.

31 Degteva M.O., Vorobyova M.I., Tolstykh E.I., Shagina N.B., Kozheurov V.P. *Questions of radiation safety*, 2000, 4, p. 36–46.

32 Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M., Shagina N.B., Shishkina E.A., Krivoshchapov V.A., Anspaugh L.R., Napier B.A. *Health Physics*, 2011, 101, p. 28–47.

33 Salnikova L.E. *Genetic determination of effects of ionizing radiation: cytogenetic and epidemiological indicators*: Disser., Moscow, 2011.

П.Н.Донов, Е.А.Блинова, А.В.Аклеев

Челябинский государственный университет, Россия
(E-mail: burmal@csu.ru)

Полиморфизм генов CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию

В статье отмечено, что полиморфные варианты генов, связанных с детоксикацией и поддержанием редокс-баланса организма, могут быть ассоциированы с индукцией активных радикалов и оксидативным стрессом, возникающим в ответ на облучение. Представлен анализ распределения частот генотипов и аллелей по полиморфным локусам генов CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 в группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. Также приведен анализ частоты встречаемости этих генотипов в группах по полу и этнической принадлежности.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, свободные радикалы, оксидативная защита, ДНК, радикалы, ферменты, мембраны, перекисное окисление липидов, витамины, цитохромы P450, радионуклеотиды, этнический состав.

Введение

Немаловажную роль в реализации последствий действия ионизирующего излучения на организм играют механизмы оксидативной защиты. Одним из эффектов воздействия ионизирующего излучения является возникновение свободных радикалов [1, 2], которые могут являться индукторами оксидативного стресса. Индукция оксидативного стресса в клетке посредством взаимодействия многих путей и компонентов может изменять палитру экспрессии генов и определять дальнейшую судьбу клетки [3]. Избыток радикалов может приводить к одиночным и множественным оксидативным повреждениям ДНК, таким как повреждения отдельных оснований, одно- и двунитевые разрывы ДНК. Эти повреждения в случае неэффективной репарации могут привести к гибели клетки или стать причиной мутаций, генетической нестабильности, малигнизации клетки [4]. Кроме повреждения ДНК, радикалы способны ингибировать ферменты, окислять липиды мембран (запуская перекисное окисление липидов)[5], тем самым нарушая функциональную активность клеток [6].

Поддержание баланса между процессами образования и утилизации активных радикалов — редокс-баланса — важный аспект жизни клетки и организма в целом. Клетки поддерживают редокс-баланс при помощи различных агентов, утилизирующих свободные радикалы, таких как глутатион, витамины С и Е, ферменты-антиоксиданты каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза [7]. Однонуклеотидные полиморфизмы в генах, кодирующих факторы, участвующие в поддержании редокс-баланса, могут влиять как на степень экспрессии генов, так и на функциональную способность соответствующих ферментов.

Фермент каталаза (CAT) выполняет функцию защиты клеточных компонентов от перекиси водорода, разлагая ее с образованием водорода и воды. Полиморфизм rs7943316 гена CAT выражается в замене -21A/T в промоторе гена, предположительно влияет на экспрессию данного гена.

Митохондриальная супероксиддисмутаза (SOD2) — фермент, дисмутирующий супероксиданион в форму пероксида водорода, который впоследствии элиминируется ферментом CAT. Полиморфный вариант T201C (rs4880) гена SOD2 выражается в аминокислотной замене, которая нарушает альфа-спираль белка SOD2; мутантный белок имеет сниженную на 30–40 % активность, увеличивая подверженность клетки оксидативному стрессу [8].

SOD3 — внеклеточная супероксиддисмутаза, оказывает защитное действие относительно окислительного повреждения ДНК и канцерогенеза у млекопитающих [9]. Полиморфизм C896G(rs1799895) связан с повышенным уровнем SOD3 в плазме крови [10].

CYP1A1 кодирует один из белков семейства цитохромов P450. Он относится к монооксигеназам, метаболизирует ксенобиотики, такие как полициклические ароматические углеводороды, содержащиеся в табачном дыме. Образующиеся промежуточные окисленные метаболиты способны реагировать с белками и нуклеиновыми кислотами [11], что может стать началом злокачественного процесса в клетке. Полиморфизм rs1048943 гена CYP1A1 приводит к аминокислотной замене Le462Val в ката-

литическом центре фермента [12] и к продукции энзима с повышенной активностью [13]. Показано, что присутствие в геноме высокоактивного аллеля гена CYP1A1 приводит к значимому увеличению частоты клеток с хромосомными aberrациями [14].

Большое число исследований говорит об ассоциации возникновения онкологических заболеваний с нарушениями функционирования глутатион S-трансфераз — ферментов-антиоксидантов, использующих глутатион в реакциях трансформации широкого спектра метаболитов и продуктов оксидативного стресса [15, 16]. Аминокислотная замена Ile105Val гена GSTP1 выражается в пониженной активности фермента [17].

Оксид азота (NO) — свободный радикал, выступающий в роли медиатора в таких процессах, как нейротрансмиссия, регуляция давления крови, антимикробная и противоопухолевая активность [1]. В организме синтезируется из L-аргинина ферментами NO-синтазами: в нейрональных клетках — NOS1, в клетках-макрофагах — NOS2, в эндотелиальных клетках — NOS3 (eNOS). При взаимодействии с радикалами кислорода в условиях оксидативного стресса NO может быть источником образования пероксинитрита. Известно, что минорный аллель гена NOS3 по полиморфизму rs1799983, выраженный в аминокислотной замене Asp298Glu, ассоциирован с различными расстройствами сердечно-сосудистой системы [18–20].

Таким образом, учитывая важную роль генов детоксикации ксенобиотиков и генов, вовлеченных в ответ на оксидативный стресс, в развитии радиационно-индуцированных эффектов актуальным является изучение распределения частот их аллелей по полиморфным локусам.

Материалы и методы

Общая обследуемая группа состояла из 172 человек, куда вошли люди, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию в 1950–1960 гг. в результате загрязнения радиоактивными отходами ПО «Маяк» бассейна реки Течи [21]. Население прибрежных сел подверглось комбинированному внешнему (преимущественно γ -) и внутреннему γ - и β -радиационному воздействию с низкой ЛПЭ. Основными источниками внешнего γ -облучения являлись: вода, донные отложения и пойменные почвы, а также участки территории населенных пунктов, загрязненные в результате хозяйственной деятельности (поливные огороды, механический перенос радиоактивности). Внутреннее облучение было обусловлено радионуклидами, поступавшими в организм с речной водой и продуктами питания местного производства (молоко, рыба, овощи с поливных огородов). Наиболее высокие уровни суммарной β -активности были обнаружены в рыбе и мясе водоплавающей птицы. Менее загрязненными смесью радионуклидов были молоко и овощи [22].

Основным дозообразующим радионуклидом являлся ^{90}Sr , который, будучи аналогом кальция, накапливался и долгое время удерживался в костной ткани. Кроме того, значимый вклад в формирование дозы внесли ^{137}Cs и ^{89}Sr , но, благодаря короткому периоду полураспада ^{89}Sr и быстрому выведению из организма ^{137}Cs , облучение за счет этих радионуклидов реализовывалось только в первые 5 лет после их поступления [23]. Все обследованные имели индивидуальную реконструированную дозу на красный костный мозг, средняя доза для общей группы составила $1,08 \pm 0,06$ Гр (от 0,0005 до 4,69 Гр). Характеристика группы по половому и этническому составу представлена в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Половой и этнический состав обследуемой группы

Полиморфизм	N, чел.	м	%	ж	%	с	%	т	%
CAT A-21T rs7943316	82	25	30	57	70	34	41	48	59
CYP1A1 Ile462Val A4889G rs1048943	172	54	31	118	69	66	38	106	62
GSTP1 Ile105Val A562G rs1695	154	51	33	103	67	59	38	95	62
NOS3 Asp298Glu T894G rs1799983	152	52	34	100	66	56	37	96	63
SOD2 Val16Ala T201C rs4880	73	21	29	52	71	30	41	43	59
SOD3 Arg231Gly C896G rs1799895	170	55	32	115	68	65	38	105	62

Примечание. «N, чел.» — количество человек, генотипированных по данному полиморфизму в общей группе; «м» — количество мужчин, «ж» — женщин, «с» — представителей славянской, «т» — тюркской этнической принадлежности в группе генотипированных по каждому из полиморфизмов.

Геномная ДНК была выделена из замороженной цельной венозной крови, хранящейся в банке тканей ФГБУН УНПЦРМ. Часть образцов была выделена с помощью набора реагентов iPrep Pure Linkg DNAB llood Kit на приборе Applied Biosystems Library Builder, а часть — методом фенол-хлороформной экстракции согласно описанной ниже методике. После размораживания 700 мкл крови переносили в пробирку эппендорф и добавляли 700 мкл 1xSSC. Центрифугировали при 12000 об./мин 2 минуты. К осадку добавляли 1400 мкл 1xSSC, перемешивали и вновь центрифугировали при 12000 об./мин 2 минуты. К осадку добавляли 270 мкл ацетатного буфера, 30 мкл 10 % SDS, инкубировали при 37 °С 1 час. Затем проводилась очистка фенол-хлороформной смесью (50/50). После центрифугирования (12000 об./мин 10 минут) надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку и осаждали ДНК 1000 мкл спирта (100 %). После кратковременного центрифугирования проводили отмывку 70 %-ным спиртом. Получившийся осадок ДНК высушивали и растворяли в 100 мкл деионизированной воды.

Генотипирование проводилось методом аллель-специфичной ПЦР «в реальном времени» с использованием наборов фирмы «Ген-Эксперт» (Москва, РФ) на амплификаторе «AppliedBiosystems StepOne™ Plus» (LifeTechnologies™, США). Анализ данных генотипирования проводился с использованием программ StepOne™ Softwarev2.1, TaqMan® GenotyperSoftwarev1.3. Для сравнения полученных в эксперименте частот аллелей с частотами европейской и азиатской популяций использовались данные интернет-ресурсов HarMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), 1000 GenomesProject (<http://www.1000genomes.org/>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Проверка соответствия распределения генотипов закону Харди-Вайнберга осуществлялась путём сравнения ожидаемых и наблюдаемых частот генотипов с использованием критерия χ^2 . Анализ ассоциации генотипов с этнической принадлежностью (ЭП) и полом проводился с использованием коэффициента χ^2 по Пирсону, статистический анализ — с помощью программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2010), STATISTICA v10 (StatSoft, Inc., 2011).

Результаты и обсуждение

Результаты генотипирования образцов ДНК исследуемой группы людей представлены в таблице 2. Проверка соответствия распределения аллельных вариантов закону Харди-Вайнберга не выявила статистически значимых отклонений, что может свидетельствовать об отсутствии факторов, способствующих отбору по данным полиморфным аллелям.

Т а б л и ц а 2

Результаты генотипирования

Полиморфизм	N, чел	Частота генотипа						Частота аллеля				χ^2	p
		AA		AB		BB		A		B			
CAT rs7943316	82	AA	12	AT	45	TT	25	A	0,42	T	0,58	1,3	0,522
CYP1A1rs1048943	172	AA	151	AG	19	GG	2	A	0,93	G	0,07	2,137	0,344
GSTP1 rs1695	154	AA	79	AG	57	GG	18	A	0,70	G	0,30	2,315	0,314
NOS3 rs1799983	152	TT	105	TG	43	GG	4	T	0,83	G	0,17	0,036	0,982
SOD2 rs4880	73	TT	24	TC	33	CC	16	T	0,55	C	0,45	0,539	0,764
SOD3 rs1799895	170	CC	170	CG	0	GG	0	C	1,00	G	0,00	0	1

Примечание. Частоты генотипов AA, AB, BB — доминантной гомозиготы, гетерозиготы, рецессивной гомозиготы соответственно (количество человек), частоты аллеля указаны в долях, p — уровень статистической значимости отличия наблюдаемых частот от ожидаемых по закону Харди-Вайнберга.

В таблице 3 представлены результаты сопоставления полученных аллельных частот с частотами в европейской и азиатской популяции.

Из данных таблицы 3 видно, что в большинстве случаев частоты аллелей в обследованной группе соответствуют «европейским» частотам. Для полиморфизма NOS3 частота минорного аллеля значительно понижена (0,17 в исследованной группе против 0,68 и 0,88 в европейской и азиатской популяциях соответственно).

Также нами был проведен анализ ассоциации генотипов по изучаемым полиморфным локусам с полом и национальностью обследованных людей, который показал достоверное различие в распределении генотипов по локусу CYP1A1 rs1048943 между славянами и тюркитами: для славян частоты

гомозигот по мажорному аллелю, гетерозигот и гомозигот по минорному аллелю были соответственно: 95,4 %, 4,6 %, 0 %, а для тюркитов: 83 %, 15,1 %, 1,9 %. Данные результаты согласуются с результатами исследования [11], в котором также наблюдалось увеличение носительства минорного аллеля среди тюркитов (башкир).

Т а б л и ц а 3

Сравнение полученных частот аллелей с мировыми популяциями

Полиморфизм	Полученные данные				Данные: HarMap, 1000 Genomes							
					Европейцы				Азиаты			
	Частота аллеля											
А		В		А		В		А		В		
1) CATrs7943316	A	0,42	T	0,58	A	0,34	T	0,66	A	0,72	T	0,28
2)CYP1A1rs1048943	A	0,93	G	0,07	A	0,97	G	0,03	A	0,74	G	0,26
3) GSTP1rs1695	A	0,70	G	0,30	A	0,68	G	0,32	A	0,83	G	0,17
4) NOS3rs1799983	T	0,83	G	0,17	T	0,32	G	0,68	T	0,12	G	0,88
5) SOD2rs4880	T	0,55	C	0,45	T	0,55	C	0,45	T	0,88	C	0,12
6)SOD3rs1799895	C	1,00	G	0,00	C	1,00	G	0,00	C	0,98	G	0,02

Примечание. А, В — частоты мажорного и минорного аллелей соответственно.

Т а б л и ц а 4

Анализ ассоциации генотипов с ЭП и полом

Полиморфизм	N	Различия, χ^2 (p)	
		по национальности	по полу
CAT rs7943316	82	1,829 (0,609)	1,610 (0,657)
CYP1A1 rs1048943	172	9,515 (0,023)	0,492 (0,921)
GSTP1 rs1695	154	1,949 (0,583)	1,802 (0,615)
NOS3 rs1799983	152	4,326 (0,228)	3,807 (0,283)
SOD2 rs4880	73	0,603 (0,896)	1,737 (0,629)
SOD3 rs1799895	170	3,714 (0,156)	1,501 (0,472)

Примечание. N — количество человек в группе, жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Заключение

В результате проведенного исследования нами были получены частотные распределения для генотипов и аллелей по полиморфным локусам CAT A-21T rs7943316, CYP1A1 Ile462ValA4889 Grs1048943, GSTP1 Ile105ValA562Grs1695, NOS3 Asp298GluT894Grs1799983, SOD2 T201CVal16 Alars4880, SOD3 C896G Arg231Gly rs1799895 в изучаемой группе. Не было выявлено отклонений наблюдаемых частот генотипов от равновесного распределения Харди-Вайнберга, что свидетельствует об отсутствии факторов отбора. Была выявлена ассоциация аллеля CYP1A1462Val с принадлежностью к этнической группе тюркитов.

Список литературы

- 1 Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, № 12. — С. 13–19.
- 2 Стюарт Ф.А. и др. Отчет МКРЗ по тканевым реакциям, ранним и отдаленным эффектам в нормальных тканях и органах — пороговые дозы для тканевых реакций в контексте радиационной защиты / Ред. А.В.Аклеев, М.Ф.Киселев; Перев. Е.М.Жидкова и Н.С.Котова. — Челябинск: Книга, 2012. — С. 248–249. (Тр. МКРЗ; публ. 118). — 384 с.
- 3 Klaunig J.E., Kamendulis L.M., Hocevar B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis // Toxicol. Pathol. — 2010. — Vol. 38, No. 1. — P. 96–109.
- 4 Kryston T.B., Georgiev A.B., Pissis P., Georgakilas A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis // Mutat. Res. — 2011. — Vol. 711, No. 1–2. — P. 193–201.
- 5 Avery S.V. Molecular targets of oxidative stress // Biochem. J. — 2011. — Vol. 434, No. 2. — P. 201–210.

- 6 *Limón-Pacheco J., Gonsbatt M.E.* The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress // *Mutat. Res.* — 2009. — Vol. 674, No. 1–2. — P. 137–147.
- 7 *Скулачев В.П.* Кислород в живой клетке: добро и зло // *Соросовский образовательный журнал.* — 1996. — № 3. — С. 4–10.
- 8 *Sutton A., Imbert A., Igoudjil A., Descatoire V., Cazanave S., Pessayre D., Degoul F.* The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability // *Pharmacogenet. Genomics.* — 2005. — Vol. 15, No. 5. — P. 311–319.
- 9 *Singh B., Bhat H.K.* Superoxide dismutase 3 is induced by antioxidants, inhibits oxidative DNA damage and is associated with inhibition of estrogen-induced breast cancer // *Carcinogenesis.* — 2012. — Vol. 33, No. 12. — P. 2601–2610.
- 10 *Sandstrom J., Nilsson P., Karlsson K., Marklund S.L.* 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269. — P. 19163–19166.
- 11 *Кочетова О.В., Корытина Г.Ф., Ахмадишина Л.З. и др.* Анализ полиморфизма гена цитохрома P450 1A1 (CYP1A1) в этнических группах Республики Башкортостан // *Генетика.* — 2008. — Т. 44, № 12. — С. 1677–1683.
- 12 *Hayashi S.-I., Watanabe J., Nakachi K., Kawajiri K.* PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene // *Nucleic Acids Res.* — 1991. — Vol. 19, No. 17. — P. 4797.
- 13 *Crofts F., Taioli E., Trachman J. et al.* Functional significance of different human CYP1A1 genotypes // *Carcinogenesis.* — 1994. — Vol. 15, No. 12. — P. 2961–2963.
- 14 *Дружинин В.Г., Волков А.Н., Головина Т.А., Глушков А.Н., Минина В.И., Ларионов А.В., Мейер А.В., Лунина А.А., Толочко Т.А.* Роль молекулярного полиморфизма генов репарации и биотрансформации в оценке радиочувствительности человека к воздействию излучений радона // *Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии: Тез. докл. Рос. науч. конф. с междунар. участием.* СПб., 19–20 мая 2011 г. — СПб.: Фолиант, 2011. — 312 с.
- 15 *Fryer A.A., Bianco A., Hepple M., Jones P.W., Strange R.C., Spiteri M.A.* Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2000. — Vol. 161, No. 5. — P. 1437–1442.
- 16 *Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, Joshua Telser.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* — 2007. — Vol. 39. — P. 44–84.
- 17 *Aguiar E.S., Giacomazzi J., Schmidt A.V., Bock H., Saraiva-Pereira M.L., Schuler-Faccini L., Duarte Filho D., dos Santos P.A., Giugliani R., Caleffi M., Camey S.A., Ashton-Prolla P.* GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening // *Rev. Bras. Epidemiol.* — 2012. — Vol. 15, No. 2. — P. 246–255.
- 18 *Berger K., Stogbauer F., Stoll M., Wellmann J., Hüge A., Cheng S., Kessler C., John U., Assmann G., Ringelstein E.B., Funke H.* The glu298asp polymorphism in the nitric oxide synthase 3 gene is associated with the risk of ischemic stroke in two large independent case-control studies // *Hum. Genet.* — 2007. — Vol. 121. — P. 169–178.
- 19 *Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D.* Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects // *Circulation.* — 2004. — Vol. 109. — P. 1359–1365.
- 20 *Jachymova M., Horky K., Bultas J., Kozich V., Jindra A., Peleska J., Martasek P.* Association of the glu298-to-asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — Vol. 284. — P. 426–430.
- 21 *Аклеев А.В.* Медико-биологические и экологические последствия радиоактивного загрязнения реки Теча / *Аклеев А.В., Киселев М.Ф.* — М.: Медбиоэкстрем, 2000. — 532 с.
- 22 *Дегтева М.О., Воробьева М.И., Толстых Е.И., Шагина Н.Б., Кожеуров В.П.* Дозиметрическая система реки Теча: реконструкция доз для оценки риска радиационных последствий // *Вопросы радиационной безопасности.* — 2000. — № 4. — С. 36–46.
- 23 *Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M., Shagina N.B., Shishkina E.A., Krivoschapov V.A., Anspaugh L.R., Napier B.A.* Reconstruction of long-lived radionuclide intakes for Techa riverside residents: strontium-90 // *Health Physics.* — 2011. — Vol. 101. — P. 28–47.

П.Н.Донов, Е.А.Блинова, А.В.Аклеев

Созылмалы радиациялық әсерге шалдыққан адамдардың CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 гендерінің полиморфизмі

Ағзаның детоксикациясы мен редокс-балансының қолдауымен байланысты гендердің полиморфтық нұсқалары сәулеге шалдығу нәтижесінде белсенді радикалдардың индукциясы мен оксидативтік есеңгіреумен байланысты болуы мүмкін. Мақалада созылмалы радиациялық әсерге шалдыққан адамдар тобындағы CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 гендердің полиморфтық локустары бойынша аллелдер мен генотиптердің жиілігін үлестіру талдауы ұсынылды. Сонымен қатар осы генотиптердің жыныс пен этникалық топтарда кездесу жиілігіне талдау жасалған.

P.N.Donov, E.A.Blinova, A.V.Akleyev

Polymorphism of genes of CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1U of the persons which have undergone chronic radiation influence

Polymorphic variants of genes related to detoxication and maintenance of redox homeostasis of the organism can be associated with the induction of active radicals and oxidative stress in response to radiation exposure. Presented in this article is an analysis of genotype and allele frequency distribution by polymorphic loci in CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 genes in a group of people chronically exposed to radiation. Also, the article presents the data resulting from an analysis of gender and ethnicity dependences of the genotype frequency in the groups studied.

References

- 1 Vladimirov Yu.A. *Sorosovsky educational magazine*, 2000, 6(12), p. 13–19.
- 2 Stjuart F.A. et al. *The report of MKRZ on fabric reactions, the early and remote effects in normal fabrics and bodies — threshold doses for fabric reactions in a context of radiation protection*, Chelyabinsk: Book, 2012, p. 248–249.
- 3 Klaunig J.E., Kamendulis L.M., Hocevar B.A. *Toxicol. Pathol.*, 2010, 38(1), p. 96–109.
- 4 Kryston T.B., Georgiev A.B., Pissis P., Georgakilas A.G. *Mutat. Res.*, 2011, 711(1–2), p. 193–201.
- 5 Avery S.V. *Biochem. J.*, 2011, 434(2), p. 201–210.
- 6 Limón-Pacheco J., Gonsebatt M.E. *Mutat. Res.*, 2009, 674(1–2), p. 137–147.
- 7 Skulachev V.P. *Sorosovsky educational magazine*, 1996, 3, p. 4–10.
- 8 Sutton A., Imbert A., Igoudjil A., Descatoire V., Cazanave S., Pessayre D., Degoul F. *Pharmacogenet. Genomics*, 2005, 15(5), p. 311–319.
- 9 Singh B., Bhat H.K. *Carcinogenesis*, 2012, 33(12), p. 2601–2610.
- 10 Sandstrom J., Nilsson P., Karlsson K., Marklund S.L. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, p. 19163–19166.
- 11 Kochetova O.V., Korytina G.F., Akhmadishina L.Z. et al. *Genetics*, 2008, 44(12), p. 1677–1683.
- 12 Hayashi S.-I., Watanabe J., Nakachi K., Kawajiri K. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(17), p. 4797.
- 13 Crofts F., Taioli E., Trachman J. et al. *Carcinogenesis*, 1994, 15(12), p. 2961–2963.
- 14 Druzhinin V.G., Volkov A.N., Golovina T.A., Glushkov A.N., Minina V.I., Larionov A.V., Meyer A.V., Lunina A.A., Tolochko T.A. *Actual problems of toxicology and radiobiology: Russian scientific conf. Proc.*, St. Petersburg: Foliant, 2011, 312 p.
- 15 Fryer A.A., Bianco A., Hepple M., Jones P.W., Strange R.C., Spiteri M.A. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, 161(5), p. 1437–1442.
- 16 Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, Joshua Telser. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39, p. 44–84.
- 17 Aguiar E.S., Giacomazzi J., Schmidt A.V., Bock H., Saraiva-Pereira M.L., Schuler-Faccini L., Duarte Filho D., dos Santos P.A., Giugliani R., Caleffi M., Camey S.A., Ashton-Prolla P. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 2012, 15(2), p. 246–255.
- 18 Berger K., Stogbauer F., Stoll M., Wellmann J., Hüge A., Cheng S., Kessler C., John U., Assmann G., Ringelstein E.B., Funke H. *Hum. Genet.*, 2007, 121, p. 169–178.
- 19 Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D. *Circulation*, 2004, 109, p. 1359–1365.
- 20 Jachymova M., Horky K., Bultas J., Kozich V., Jindra A., Peleska J., Martasek P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 284, p. 426–430.
- 21 Akleev A.V. *Medicobiological and ecological consequences of radioactive pollution of the Techa River*, Moscow: Medbioekstrem, 2000, 532 p.
- 22 Degteva M.O., Vorobyova M.I., Tolstykh E.I., Shagina N.B., Kozheurov V.P. *Questions of radiation safety*, 2000, 4, p. 36–46.
- 23 Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M., Shagina N.B., Shishkina E.A., Krivoschchapov V.A., Anspaugh L.R., Napier B.A. *Health Physics*, 2011, 101, p. 28–47.

Г.П.Погосян, К.А.Жумашева, А.А.Коновалова

Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова
(E-mail: zkkbg@mail.ru)

Определение мутагенной активности производных тиазола и бензотиазола

В статье представлены данные об изучении потенциальных лекарственных препаратов. Проведен анализ 2-амино-4-фенилтиазола и 7-бром-2-аминобензотиазола на предмет обнаружения мутагенной активности с применением теста Эймса. Для выявления мутации замены пар оснований и сдвига рамки считывания использовались штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. В ходе эксперимента не выявлено мутагенной активности исследуемых веществ при использовании обоих штаммов.

Ключевые слова: тиазол, бензотиазол, фосфорилирование, биологическая активность, мутагенез, мутации, тест Эймса, генотоксичность, *Salmonella typhimurium*, штамм, тест-система, сдвиг рамки считывания, вставка-выпадение нуклеотида, мутагенная активность, гистидиновый оперон, прототрофность, ауксотрофность.

Появление новых химических соединений требует проведения исследований для определения свойств, с целью дальнейшего их использования в качестве фармацевтических препаратов. В связи с быстрыми темпами развития фармакологической науки во всем мире значительно увеличился интерес к органической химии как основному источнику биологически активных веществ. Значительный интерес представляет химия гетероциклических соединений. Это связано с целым рядом особых свойств, проявляющихся у подобных веществ. К данным свойствам можно отнести различные виды фунгицидной, акарицидной, фармакологической активности, новые оптические свойства получаемых органических соединений, возможность их применения во многих отраслях человеческой деятельности. Изучение мутагенной активности вновь синтезированных химических соединений необходимо для возможного их применения в качестве лекарственных препаратов.

Для определения мутагенного действия новых веществ в настоящее время используются методы, позволяющие определить возникновение генных и хромосомных мутаций. Тест, выявляющий наличие генных мутаций, разработан в лаборатории доктора Эймса. Он основан на определении ревертантных колоний штаммов *S.typhimurium*, ауксотрофных по гистидину, к прототрофности. В работе использованы два штамма *S.typhimurium* TA 98 и TA 100, позволяющие определить мутации двух типов: замены пар оснований и сдвига рамки считывания. Тестирование с применением этих двух штаммов позволяет всесторонне анализировать возможное мутагенное действие исследуемых веществ. В настоящее время в цитогенетических лабораториях также используется микроядерный тест, позволяющий без больших материальных и временных затрат определить хромосомные мутации в мазках крови лабораторных животных в качестве модельных объектов [1, 2].

С целью выявления возможного мутагенного влияния веществ, синтезированных учеными химического факультета КарГУ имени Е.А.Букетова, использовали методики, позволяющие оценить мутагенную активность. На сегодняшний день известны экспресс-методы для определения генных и хромосомных мутаций. Эти методы позволяют в короткие сроки, без больших материальных и временных затрат и в то же время с высокой степенью достоверности определить мутагенную активность испытуемых веществ.

В лаборатории молекулярной генетики исследовательского парка биотехнологии и экомониторинга биолого-географического факультета КарГУ имени Е.А.Букетова имеются штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. Штаммы приобретены из Республиканской коллекции микроорганизмов. Из-за специально вызванных мутаций в гистидиновом опероне эти штаммы являются ауксотрофами по гистидину. Но под влиянием мутагена происходит реверсия к прототрофности, и штаммы обретают способность синтезировать гистидин. Используемые в настоящей работе культуры характеризуются наличием плазмиды рКМ 101, которая увеличивает вклад ошибочной репарации ДНК в общий процесс восстановления после мутагенного воздействия, тем самым значительно повышает чувствительность метода. Кроме того, эта плазида придает штаммам устойчивость к ампициллину, что облегчает их хранение на чашках с питательными средами. Причем штамм TA 98 ревертирует к прототрофности путем сдвига рамки считывания, а штамм TA 100 — путем замены пар оснований [3].

В ходе эксперимента тестировали производные тиазола и бензотиазола, а именно 2-амино-4-фенилтиазола и 7-бром-2-аминобензотиазола. Следуя рекомендациям методики, вещества испытывали в концентрациях 0,1000 мг/мл, 0,0100 мг/мл, 0,0010 мг/мл. В качестве позитивного контроля использовали циклофосфан (500 мг/чашку) для штамма ТА 100 и бромистый этидий (10 мг/мл) для штамма ТА 98. В качестве негативного контроля применяли стерильную дистиллированную воду, а также диметилсульфоксид, который являлся растворителем исследуемых соединений.

Для проведения эксперимента первоначально определяли соответствие штаммов генотипам. Для этого высевали их на чашки Петри с эндо агаром, способствующим росту микроорганизмов группы энтеробактерий, к которым относятся и штаммы *Salmonella typhimurium*. В среду добавляли ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для определения ауксотрофности по гистидину выращивали ночную культуру, высевали на чашки Петри с минимальной средой с целью получения газона бактериальной культуры. Затем наносили гистидин и стерильную воду на стерильный диск фильтровальной бумаги, помещенный в середину чашки [4].

После определения генотипов штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 проводили исследования на определение генных мутаций испытываемых веществ.

С каждым штаммом проводили эксперимент по 10 раз. Каждый раз определяли титр бактериальной культуры. Для этого ночную культуру подращивали в 100 мл питательной среды (мясопептонном бульоне) при непрерывном покачивании в шейкере. Для определения титра культуры проводили серию десятикратных разведений в стерильной дистиллированной воде. Затем шпательным методом высевали культуру на чашки со средой эндо с 6 и 7 разведениями. Выращивали штаммы в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 часов. Затем подсчитывали количество выросших колоний на чашках с соответствующим разведением культуры. Титр культуры *Salmonella typhimurium* ТА 98 составлял $2,2\text{--}2,7 \times 10^9$, *Salmonella typhimurium* ТА 100 — $2,5\text{--}3,1 \times 10^9$.

Фотография одного из экспериментов представлена на рисунке.

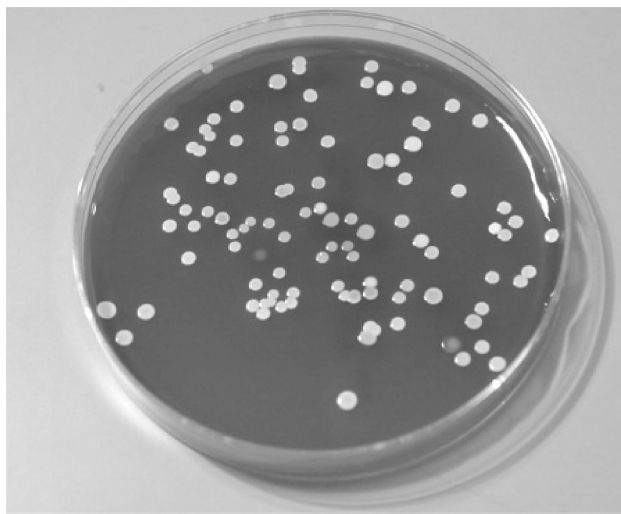


Рисунок. Рост колоний *Salmonella typhimurium* ТА 98 из седьмого разведения

Рисунок демонстрирует количество колоний, выросших после серий десятикратных разведений. Процедура необходима для определения титра бактериальной культуры с целью анализа данных, полученных в результате эксперимента.

Большое количество бактериальных клеток, составляющее в наших экспериментах 10^9 , необходимо для определения возможной мутагенной активности тестируемых веществ. Учитывая, что спонтанные мутации возникают с частотой 1 на $10^6\text{--}10^7$ клеток, нам удалось вырастить индикаторные штаммы до нужной степени.

С полученной суспензией штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 проводили последующие манипуляции. Для этого вносили в пробирки с верхним полужидким агаром последовательно тестируемое вещество, биотин, гистидин и один из используемых штаммов. Чтобы не застыл агар и в то же время не погибла культура микроорганизмов, поддерживали температуру среды 45 °С. После наслоения верхнего агара на нижний минимальный 1,5 %-ный агар чашки подсушивали в течение

30–40 минут, ставили в термостат на 37 °С. Количество колоний-ревертантов подсчитывали через 48 часов.

В экспериментах со штаммами *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 использовали по 3 чашки для каждой концентрации тестируемого вещества.

Для оценки степени мутагенности использовали шкалу, предложенную Эймсом, Фонштейном. Согласно ей возможны результаты, приведенные ниже:

1. Количество колоний на опытных и контрольных чашках различается более чем в 2,5 раза. Следовательно, в данном эксперименте мутагенной активности не выявлено, проставляли индекс мутагенности (–).

2. Число колоний на опытных чашках превышает контрольное в 2,5–10 раз. Выявлена слабая степень мутагенной активности. Индекс мутагенности (+).

3. Число ревертантных колоний на опытных чашках на один — два порядка превышает контрольное. Выявлена средняя степень мутагенной активности. Индекс мутагенности (++).

4. Число колоний на опытных чашках более чем в 100 раз превышает показатель числа колоний на чашках с чистым контролем. Выявлена сильная степень мутагенной активности. Индекс мутагенности (+++). [5]

Результаты анализа мутагенной активности 2-амино-4-фенилтиазола приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Уровень колоний-ревертантов штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100, выросших под действием 2-амино-4-фенилтиазола

Штамм	Количество колоний						
	2-Амино-4-фенилтиазол			Контроль положительный		Контроль отрицательный	
	0,1000 мкг/мл	0,0100 мкг/мл	0,0010 мкг/мл	Бромистый этидий	Цикло- фосфан	Стерильная вода	ДМСО
ТА 98	55	78	65	$2,5 \times 10^4$	–	23	68
ТА 100	175	190	180	–	$3,4 \times 10^4$	154	200

Как видно из таблицы 1, количество колоний-ревертантов на чашках с 2-амино-4-фенилтиазолом соизмеримо с уровнем бактерий на среде с добавлением отрицательных контрольных образцов: стерильной воды и диметилсульфоксида. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности испытуемого соединения. Не обнаружено увеличения количества ревертантных колоний *Salmonella typhimurium* ни в случае со штаммом ТА 98, ни при использовании штамма ТА 100. Следовательно, 2-амино-4-фенилтиазол не вызывает генных мутаций ни с заменой пар оснований, ни со сдвигом рамки считывания.

С целью определения мутагенной активности 7-бром-2-аминобензотиазола проводили исследования, аналогичные описанным выше при тестировании 2-амино-4-фенилтиазола. Определяли мутации замены пар оснований и сдвига рамки считывания. Выращивали культуры штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 до плотности 10^6 – 10^7 . Освежали их, помещая в колбы с мясopептонным бульоном и продолжали выращивать при температуре 37 °С с покачиванием. После центрифугирования и промывания в фосфатном буфере ресуспендировали клетки, доводя плотность культуры до 10^9 . Для определения титра бактериальных культур *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 проводили серию десятикратных разведений в стерильной воде. С целью определения титра бактериальной культуры высевали на чашки с 6 и 7 разведениями. Количество бактериальных клеток в 1 мл в среднем составляло: для штамма *Salmonella typhimurium* ТА 98 — 10^9 , для штамма *Salmonella typhimurium* ТА 100 — 10^9 .

Как и в случае с тестированием 2-амино-4-фенилтиазола, в экспериментах со штаммами *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100 использовали по 3 чашки для каждой концентрации тестируемого вещества. Каждый эксперимент выполняли в десяти повторностях. Подсчитывали количество колоний с обратными мутациями от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Средние данные по количеству колоний-ревертантов, выросших при тестировании 7-бром-2-аминобензотиазола, положительных и отрицательных контрольных образцов, представлены в таблице 2.

Уровень колоний-ревертантов штаммов *Salmonella typhimurium* ТА 98 и ТА 100, выросших под действием 7-бром-2-аминобензотиазола

Штамм	Количество колоний						
	7-Бром-2-аминобензотиазол			Контроль положительный		Контроль отрицательный	
	0,1000 мкг/мл	0,0100 мкг/мл	0,0010 мкг/мл	Бромистый этидий	Цикло- фосфан	Стерильная вода	ДМСО
ТА 98	30	27	43	2500	–	23	35
ТА 100	220	180	200	–	3400	150	190

Данные таблицы 2 демонстрируют отсутствие мутагенной активности 7-бром-2-аминобензотиазола, поскольку количество ревертантных колоний, выросших на минимальной среде при добавлении тестируемого вещества, а также отрицательных контрольных образцов стерильной воды и диметилсульфоксида оказалось приблизительно одинаковым при использовании обоих штаммов — как *Salmonella typhimurium* ТА 98, так и *Salmonella typhimurium* ТА 100. Этот факт доказывает, что 7-бром-2-аминобензотиазол не вызывает ни мутации типа сдвига рамки считывания, ни замены пар оснований.

В среднем титр бактериальной культуры составил у штамма *Salmonella typhimurium* ТА 98 — $2,2 \times 10^9$. В 6-м разведении — от 118 колоний до 270, в 7-м — от 13 до 36 колоний. Для штамма *Salmonella typhimurium* ТА 100 — $2,7 \times 10^9$. В 6-м разведении — от 170 колоний до 310, в 7-м — от 26 до 35 колоний.

Дальнейшие исследования предполагают расширение спектра тестируемых соединений с потенциальной фармацевтической активностью, а также продолжение тестирования 2-амино-4-фенилтиазола и 7-бром-2-аминобензотиазола в микробиологическом тесте Эймса с метаболической активацией *in vivo in vitro*.

Список литературы

- 1 Харбиев Р.В. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
- 2 Мутагены (скрининг и фармакологическая профилактика воздействий) / А.Д.Дурнев, С.Б.Середенин. — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
- 3 Оценка мутагенности новых лекарственных средств: Метод. рекомендации. — М., 1994. — 20 с.
- 4 Bahrami K., Khodae M.M., Naali F. Mild and Highly Efficient Method for the Synthesis of 2-Arylbenzimidazoles and 2-Arylbenzothiazoles // J. Org. Chem. — 2008. — Vol. 73. — P. 6835–6837.
- 5 Гуськова Т.Д. Оценка безопасности лекарственных средств на стадии доклинического изучения // Хим.-фарм. журн. — 1990. — № 7. — С. 10–15.

Г.П.Погосян, К.А.Жумашева, А.А.Коновалова

Тиазол мен бензотиазол туындыларының мутагенді белсенділігін анықтау

Мақалада 2-амино-4-фенилтиазол мен 7-бром-2-аминобензотиазол потенциалдық дәрілік құралдарының мутагенді белсенділігін зерттеу бойынша мәліметтер ұсынылды. Сыналып жатқан заттар Эймс тестісін пайдалану арқылы жүзеге асты. Негіздер жұптарының алмасуы және оқу жиіктемелерінің жылжып кетуі сияқты мутацияларды анықтау үшін *Salmonella typhimurium* ТА 98 бен ТА 100 штамдары қолданылды. Осы екі штамның пайдалануымен өткізілген сынақ-тәжірибелердің нәтижелері бойынша зерттелінген заттардың мутагенді белсенділігі анықталған жоқ.

G.P.Pogosyan, K.A.Zhumasheva, A.A.Konovalova

Determination of mutagenic activity of thiazole and benzothiazole derivatives

This article contains research data about the potential drugs of 2-amino-4-phenyl-thiazole and 7-bromo-2-aminobenzothiazole for mutagenic activity detection. The tested compounds were studied using the Ames test. The strain *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 were used for detecting a mutation base pair substitutions and frame shift. The experiments showed no mutagenic activity of test substances using both strains.

References

- 1 Kharbiev R.U. *Guidelines for experimental (preclinical) studies of new pharmacological agents*, Moscow: Meditsina, 2005, 832 p.
- 2 Durnev A.D., Seredenin S. *Mutagens (screening and pharmacological prevention interventions)*, Moscow: Meditsina, 1998, 328 p.
- 3 *Evaluation of mutagenicity of new drugs: Guidelines*, Moscow, 1994, 20 p.
- 4 Bahrami K., Khodae M.M., Naali F. *J. Org. Chem.*, 2008, 73, p. 6835–6837.
- 5 Gus'kova T.D. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1990, 7, p. 10–15.

А.С.Жолболсынова¹, А.Т.Кажмуратова², И.М.Джемалединова¹,
Д.Е.Дощанов¹, Д.А.Валитов¹, А.У.Бектемисова¹

¹Северо-Казахстанский государственный университет им. М.Козыбаева, Петропавловск;

²Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова
(E-mail: kazhmuratova@mail.ru)

Влияние композиций из поливинилового спирта и крахмала на рост и развитие овса

В статье показано, что предпосевная обработка семян овса композицией поливинилового спирта и крахмала стимулирует рост, развитие, повышает урожай и улучшает качество зерна овса. Авторами отмечено, что компоненты композиций производятся промышленным способом и потому могут иметь широкую область применения в растениеводстве.

Ключевые слова: предпосевная обработка семян, поливиниловый спирт, кукурузный и картофельный крахмал, полимеры, пленкообразование, овес сорта «Мирный», полевая всхожесть, сохранность растений, структура урожая, урожайность.

Для устойчивого наращивания производства высококачественной продукции, и в первую очередь зерна, может внести определенный вклад использование био- и синтетических полимеров. Они способны регулировать рост, развитие растений, защищать их от неблагоприятных условий, воздействовать на качество почвы. В большинстве случаев в сельском хозяйстве практикуется предпосевная обработка семян полимерами или композициями на их основе [1]. При этом полимер должен отвечать следующими требованиями: хорошо растворяться в воде при данной температуре; не быть токсичным ни до, ни после применения; хорошим адгезивом, чтобы надежно удерживаться на семенах; соединять все прочие компоненты; дешевым и доступным [2]. К числу таких ВМС относится и объект нашего исследования — поливиниловый спирт (ПВС). Это бесцветное твердое вещество, которое в зависимости от способа изготовления получается в форме порошка, волокон или хлопьев. Он растворим в воде, не токсичен, совмещается с низко- и высокомолекулярными соединениями. ПВС применяется при получении синтетического волокна, клея, упаковочных материалов для продуктов питания, изготовлении пластырей, стерильных материалов, хирургических нитей, пленок медицинского назначения, как кровезаменитель [3]. Он имеет и высокие адгезионные характеристики, вследствие чего наиболее приемлем для семеноведения [4]. Нами разработана и применена композиция, включающая ПВС и крахмал, для предпосевной обработки семян зерновых культур. Крахмал — порошок белого или слегка желтого цвета. Главные источники получения крахмала — картофель, кукуруза, пшеница, рис, сорго. Он растворим, не токсичен. Крахмал широко применяется в пищевой, химической, полиграфической, бумажной, парфюмерной и других отраслях промышленности. Он ускоряет образование пленки ПВС и упрочняет её.

Картофельный крахмал. Его используют при выработке фруктово-ягодных киселей, для загущения супов, соусов, подливок, в производстве некоторых видов колбасных изделий, сосисок, сарделек, для стабилизации некоторых видов кондитерских кремов, изготовления клеящих веществ, выработки искусственного саго. Он используется и в технических целях в текстильной, бумажной, полиграфической промышленности, а также в быту. Зерна картофельного крахмала самые крупные (диаметр 0,05–0,08 мм), овальной формы. Картофельный крахмал обладает более ценными потребительскими достоинствами, чем кукурузный. Клейстеризуется он быстрее, при более низкой температуре, клейстер получается более вязкий. По качеству картофельный крахмал делят на сорта: экстра, высший, первый и второй. Картофельный крахмал 2 сорта в продажу не поступает, его используют для технических целей или как сырье для выработки патоки и глюкозы. Цвет крахмала чисто белый, а высшего сорта — обязательно с блеском. Картофельный крахмал 2 сорта может иметь желтоватый оттенок. Методом гель-фильтрации через сефадекс В 200 сефарозу-28 картофельный крахмал разделяется на 9 фракций с молекулярной массой от 7×10^6 до 73×10^6 .

Кукурузный крахмал применяют в производстве соусов, начинок для пирогов, пудингов. Его используют как добавку при выпечке булочных и кондитерских изделий в тех случаях, когда надо ослабить действие клейковины и придать большую мягкость и нежность продукту с одновременным

уменьшением добавки сахара и жира (бисквитный полуфабрикат, вафельные стаканчики для мороженого, печенье). Пересушенный кукурузный крахмал с пониженной влажностью используют в кондитерской промышленности при отливке мягких конфет и корпусов шоколадных конфет. Кукурузный крахмал широко применяют в технических целях бумажного производства, в текстильной и медицинской промышленности. Его зерна значительно мельче (0,02–0,03 мм), имеют форму многогранника, с трещиной в середине, расходящейся в стороны. Кукурузный крахмал бывает высшего и первого сорта. 1 сорт может иметь желтоватый оттенок.

Введение добавок в процессе пленкообразования приводит к формированию структуры разного типа и изменению свойств покрытий (равновесной степени, скорости растворения, величины разрушающего напряжения), влияющих на ростовые свойства семян и развитие корневой системы. Исходя из совместимости ПВС и крахмала были определены соотношения компонентов в композиции. Установлено, что при составе 3 % мас. ПВС – 6 % мас. крахмала время образования и высыхания пленки минимально и прочность её высокая [5, 6].

Целью нашего исследования явилось изучение влияния этой композиции на рост и развитие овса сорта «Мирный». Сорт среднеспелый, устойчив к пыльной головне (0,9–4,9 %), слабо восприимчив к коронарной ржавчине (50/2), засухоустойчивость высокая. Имеет крупное (масса 1000 зёрен 36,1–37,5 г), выровненное зерно, пониженная пленчатость (24,5–25,6 %), с натурой 552–567 г/л, содержание белка в зерне 12,8–13,5 %. Сорт зернового назначения для продовольственных и фуражных целей, но благодаря большей высокорослости, устойчивости к полеганию и грибковым болезням может быть использован и для выращивания на зелёный корм в смеси с зернобобовыми культурами. Сорт хорошо отзывается на повышение агрофона. Обладает высокой технологичностью возделывания, в том числе по интенсивной технологии [5].

Овес — это важнейшая зернофуражная культура [7]. Он представлен приблизительно 70 видами, из которых только 11 имеют практическое значение; используется в продовольственных и кормовых целях [8]. Зерно овса используется для производства круп, геркулеса, толокна, галет, суррогата кофе, а также в диетическом и детском питании. Овес — незаменимое кормовое растение, широко применяемое на зелёный корм, сено, силос [9].

Согласно цели были проведены полевые испытания по следующим вариантам: 1 — контроль; 2 — предпосевная обработка семян овса композицией (ПВС–крахмал кукурузный); 3 — предпосевная обработка семян овса композицией (ПВС–крахмал картофельный).

Для решения поставленных задач были проведены лабораторные и полевые исследования. Лабораторные исследования проводились в лаборатории химии растений и биологически активных соединений СКГУ им. М.Козыбаева, полевые опыты — на агробиологической станции СКГУ им. М.Козыбаева.

При выращивании овса применялась агротехника, рекомендованная для Северо-Казахстанской области Северо-Казахстанской сельскохозяйственной опытной станцией. Весенняя подготовка почвы включала ранневесеннее боронование в два-три следа боронами БИГ-3, предпосевную культивацию на 8–10 см глубиной культиватором КПП-2,2 и прикатывание кольчато-шпоровыми катками ЗКК-6А.

Семена замачивали в течение 6 часов в растворах биологически активных веществ, затем высушивали на воздухе, смешивали в необходимых соотношениях на брезенте в хорошо проветриваемом помещении. После этого устанавливали сеялку на норму высева смесей до выезда в поле.

Посев проводили сеялкой СЗС-2,1 в один рядок оба компонента на глубину 4–5 см. Посев был произведен 26 мая. Опыты закладывались в 4-кратной повторности. Площадь делянок 200 м². Размещение вариантов последовательное. Все учётные и наблюдения проводились согласно методике ВНИИ кормов. Математическая обработка экспериментальных данных рассчитывалась по Б.А.Доспехову [10].

Для приготовления композиции можно использовать любую смесительную ёмкость. Отдельно готовим раствор ПВС при нагревании до 80–90 °С и раствор крахмала — при 25–30 °С, при непрерывном перемешивании. Затем в смесителе, при постоянном перемешивании, к раствору ПВС постепенно приливаем раствор крахмала. Перемешивание продолжаем 1–2 минуты, после чего раствор сливаем в приготовленную ёмкость, охлаждаем до комнатной температуры. Полученная таким образом композиция готова к применению. Предварительно была проведена подготовка семян к посеву, а именно очистка, просушивание, сортирование. Затем в ёмкость для дражирования засыпали семена, приливали раствор так, чтобы они полностью покрылись, выдерживали 2–5 минут при небольшом перемешивании, удаляли избыток раствора. Отработанные семена сушили на воздухе слоем толщи-

ной 20–30 см до полного высыхания полимерной пленки. При предпосевной обработке семян композицией ПВС–крахмал при набухании образовавшейся пленки происходит постепенное проникновение крахмала внутрь семени.

После этого семена овса высевались в почву (чернозем обыкновенный, маломощный, среднеуглинистый). Климат региона резко континентальный, что выражается недостаточностью увлажнения и сравнительно большими амплитудами колебания как среднемесячных температур самого холодного (январь) и самого теплого (июль) месяцев, так и особенно большой разницей минимальных и максимальных температур.

Холодная продолжительная зима с устойчивым снежным покровом сочетается с жарким, но коротким летом. На севере Казахстана зима наступает в октябре и продолжается 5–7 месяцев, лето приходит в конце мая и длится до конца августа. Теплый период года с температурой выше +10 °С в северном регионе составляет 130 дней (с 10 мая по 16 сентября).

По сумме положительных температур, продолжительности безморозного периода и количеству осадков за вегетационный период территория области относится к умеренно-засушливому агроклиматическому району.

При прорастании семян под влиянием амилазы крахмал разлагается до сахаров. Установлено, что имеются две амилазы (α и β). α -Амилаза появляется при прорастании семян, а β -амилаза находится главным образом в покоящихся семенах. Если α -амилаза разлагает обе фракции крахмала, то β -амилаза почти полностью гидролизует амилозу и лишь частично амилопектин. При этом в первую очередь освобождаются олигосахариды, которые расщепляются до мальтозы. Распад крахмала сопровождается и синтезом целлюлозы, являющимся составной частью новообразовавшихся тканей и органов прорастающих семян. Следовательно, образующиеся сахара при прорастании семян расходуются не только в процессе дыхания, но и для синтеза новых соединений, необходимых для нормального функционирования проростка.

Результаты проведенных исследований приведены в таблицах 1–3.

Т а б л и ц а 1

Влияние композиций на основные показатели первого периода вегетации растений

Показатели	Вариант		
	1	2	3
Полевая всхожесть, %	96±0,22	98±0,23	98±0,23
Количество всходов, штук/м ²	376,1±0,2	379,3±0,1	379,2±0,4
Сохранность растений, %	87±0,3	89±0,6	90±0,1

Видно, что наилучшие показатели получены в 3-м варианте. Так, полевая всхожесть семян, сохранность и густота стояния растений превысили контроль на 2; 0,8; 3 %, соответственно. Эти же показатели практически одинаковы для 2-го и 3-го вариантов.

Надо отметить, что сроки посева, глубина заделки семян, температура и влажность почвы были одинаковы для всех вариантов. Они существенно влияют, в частности, на полевую всхожесть, определяющую в какой-то степени уровень урожая, особенно в зоне Северо-Казахстанской области, из-за крайне неустойчивой погоды весной и в начале лета.

Т а б л и ц а 2

Влияние композиций на продуктивность овса

Показатели	Вариант		
	1	2	3
Высота растений, см	55,2±0,4	56,4±0,3	57,3±0,8
Длина колоса, см	12,1±0,1	12,8±0,1	13,6±0,3
Количество растений, млн/га	63,3±0,6	64,1±0,3	65,4±0,7
Вес колоса, г	0,72±0,1	0,74±0,4	0,76±0,2

Из таблицы следует, что самые высокие показатели у 3-го варианта. Так, например, высота растений, длина колоса, количество растений, вес колоса на 2; 8,3; 2, 4,1 %, соответственно, выше контроля. Разница в показателях между 2-м вариантом и контролем оказалась меньше аналогичных с 3-м. Практически одинаковы показатели для 2-го и 3-го вариантов.

Т а б л и ц а 3

Качественные показатели зерна овса

Показатели	Вариант		
	1	2	3
Сырой протеин, %	8,71±0,12	8,94±0,41	9,12±0,23
Клетчатка, %	13,2±0,2	13,6±0,5	14,1±0,4
Зольность, %	3,11±0,23	2,87±0,16	2,85±0,24
Пленчатость, %	21±0,25	23±0,1	23±0,1

Видно, что в 3-м варианте получены более высокие показатели. Так, содержание сырого протеина, клетчатки, а также зольность оказались на 0,38; 1,1; 2 %, соответственно, выше контроля. В то же время перечисленные выше показатели для 2-го и 3-го вариантов практически не различались.

Обработка дает и определенный экономический эффект. Данные по экономической эффективности приводятся в таблице 4.

Т а б л и ц а 4

Экономическая эффективность возделывания овса сорта «Мирный»

Показатели	Вариант		
	1	2	3
Посевная площадь, га	1	1	1
Урожайность, ц/га	19,2±0,4	21,2±0,1	22,5±0,6
Стоимость 1 ц, тенге	3510	3510	3510
Выручка, тенге	67392	74412	78975
Производственные затраты, тенге	30195	32985	34705
Прибыль, тенге	37197	41427	44270
Рентабельность, %	123	125	127

При расчете его учитывались все затраты, связанные с агротехникой овса и обработкой семян композицией. Чистая прибыль во втором варианте составила 56573 тенге/га и в третьем — 604690 тенге/га.

Таким образом, предпосевная обработка семян овса композицией ПВС–крахмал (кукурузный и картофельный) стимулирует рост, развитие растения, повышает урожай овса, улучшает качество зерна. Кроме того, такая обработка семян позволяет высевать на 10–15 дней раньше установленного срока. Компоненты композиций (ПВС–кукурузный крахмал, ПВС–картофельный крахмал) производятся промышленным способом и потому могут иметь широкую область применения в растениеводстве.

Список литературы

- 1 *Алексейчук Г.Н.* Современная технология предпосевной обработки семян и её биологические основы // Наука и инновации. — 2006. — Т. 43, № 9. — С. 37–41.
- 2 *Ягодин Б.А. и др.* Агрехимия. — М.: Колос, 2002 — 544 с.
- 3 *Кулезнев В.Н.* Химия и физика полимеров. — М.: Колос, 2007. — 367 с.
- 4 *Муха В.Д. и др.* Агрономия. — М.: Колос, 2001. — 504 с.
- 5 *Бекмухамбетов Э.Л.* Кормовые растения Казахстана. — Алматы: Бастау, 2006. — 304 с.
- 6 *Технология переработки растениеводческой продукции / Личко Н.М., Кудрина В.Н., Мельников Е.М.* — М.: Колос, 2008. — 587 с.
- 7 *Шпаар Д. и др.* Зерновые культуры. — Минск: ФУАинформ, 2000. — 421 с.
- 8 *Кошкин В.А.* Каталог мировой коллекции ВИР // Овес и ячмень. — СПб., 2010. — Вып. 799. — 37 с.
- 9 *Личко Н.М.* Стандартизация и сертификация растениеводческой продукции. — М.: Колос, 2003. — 210 с.
- 10 *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — С. 18–19.

А.С.Жолболсынова, А.Т.Кажымуратова, И.М.Джемалединова,
Д.Е.Дошанов, Д.А.Валитов, А.У.Бектемісова

**Сұлының өсіп-өнуіне поливинил спирті
мен крахмалдан тұратын композицияның әсері**

Сұлы тұқымдарын себу алдында поливинил спирті мен крахмал композициясымен өңдеу сұлының өсіп-дамуын жылдамдатады, түсімін жоғарылатады және сұлы дәнегінің сапасын жақсартады. Авторлардың пайымдауынша, композицияның құрам бөліктері өндірістік тәсілдермен өндіріледі, сондықтан өсімдік шаруашылығында кеңінен қолданыла алады.

A.S.Zholbolsynova, A.T.Kazhmuratova, I.M.Dzhemaledinova,
D.E.Doshchanov, D.A.Valitov, A.U.Bektemisova

**Effect of composition polyvinyl alcohol and starch
on the growth and development oats**

Oat seed dressing formulation of polyvinyl alcohol and starch stimulates growth, development, increases the yield and improves the quality of the grain oats. Components of the compositions are produced industrially and therefore may have a wide range of applications in plant breeding.

References

- 1 Alekseichuk G.N. *Science and Innovation*, 2006, 43(9), p. 37–41.
- 2 Yagodin B.A. *Agrochemicals and others*, Moscow: Kolos, 2002, 544 p.
- 3 Kuleznev V.N. *Chemistry and physics polimerov*, Moscow: Kolos, 2007, 367 p.
- 4 Mukha V.D. *Agriculture and others*, Moscow: Kolos, 2001, 504 p.
- 5 Bekmukhambetov E.L. *Food plants of Kazakhstan*, Almaty: Bastau, 2006, 304 p.
- 6 Licko N.M., Kudrin V.N., Melnikov E.M. *Processing technology for crop production*, Moscow: Kolos, 2008, 587 p.
- 7 Shpaar D. *Crops*, Minsk: FUAinform, 2000, 421 p.
- 8 Koshkin V.A. *Oats and barley*, St. Petersburg, 2010, 799, 37 p.
- 9 Lichko N.M. *Standardization and certification of crop production*, Moscow: Kolos, 2003, 210 p.
- 10 Dospikhov B.A. *Methods of field experience*, Moscow: Agropromizat, 1985, p. 18–19.

УДК [616.379–008.64–06:617.58]–097

И.И.Долгушин, Ю.О.Тарабрина, О.Л.Колесников, А.А.Колесникова

*Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия
(E-mail: olekol08@rambler.ru)*

Функциональное состояние клеток врожденного иммунитета у пациентов с синдромом диабетической стопы

В статье приведены данные обследования 14 пациентов, страдающих сахарным диабетом 2 типа с синдромом диабетической стопы, и 22 человека из группы сравнения. Отмечено, что у больных с синдромом диабетической стопы в 9,1 раза снижено процентное содержание нейтрофилов, способных формировать внеклеточные ловушки в цельной крови, и на 9,6 % уменьшено количество моноцитов, формирующих внеклеточные ловушки. Показано также, что при наличии синдрома диабетической стопы у моноцитов снижена способность к выработке активных форм кислорода (по результатам НСТ-теста), при сохраненной функции поглощения чужеродных объектов. Определено, что нейтрофилы больных с синдромом диабетической стопы демонстрировали активацию фагоцитоза (фагоцитарное число увеличивалось на 40,8 %), но обладали уменьшенной выраженностью реакции на внешние стимулы. Таким образом авторами установлено, что синдром диабетической стопы определяет развитие дисбаланса в системе врожденного иммунитета.

Ключевые слова: сахарный диабет, иммунная система, нейтрофилы, моноциты, гликемия, уровень глюкозы, активные формы кислорода, гемоглобин, диабетическая стопа, фагоцитоз, ДНК.

Сахарный диабет в настоящее время представляет собой одну из самых актуальных проблем медицины. Это связано, в первую очередь, с широким распространением этой патологии. В последние 30 лет заболеваемость сахарным диабетом неуклонно повышается. Количество больных сахарным диабетом удваивается каждые 10–15 лет. В 2000 г. во всем мире страдало сахарным диабетом около 171 миллиона человек, в 2006 г. — 246 миллионов. По прогнозу на 2030 г. число больных этим заболеванием составит примерно 366 миллионов. При этом более 80 % случаев составляет сахарный диабет типа 2. Обращает на себя внимание тот факт, что прирост наиболее выражен среди лиц старше 65 лет. Это, скорее всего, связано с широкой распространенностью и преобладанием сахарного диабета 2 типа [1]. По оценке ВОЗ число больных сахарным диабетом в 2011 г. составило в Российской Федерации 3,357 млн. человек [2]. При сахарном диабете страдают все виды обмена веществ, нарушаются функции не только эндокринной, но и сердечно-сосудистой и нервной систем. При недостаточном контроле уровня сахара в крови формируются различные осложнения, что является причиной развития инвалидности и часто приводит к ранней смерти пациентов.

Сахарный диабет неблагоприятно воздействует и на иммунную систему. Отмечается нарушение функций нейтрофилов, связанное, по мнению авторов, с плохим контролем гликемии [3]. При инкубации нейтрофилов в среде с высоким уровнем глюкозы уменьшалась способность к формированию активных форм кислорода [4]. У больных сахарным диабетом с тяжелыми осложнениями возрастала способность моноцитов реагировать выработкой активных форм кислорода на действие чужеродных агентов, что отразилось в статистически значимом увеличении функционального резерва моноцитов. Нейтрофилы таких пациентов обладали повышенной способностью к фагоцитозу [5]. Интенсивность фагоцитоза у пациентов с сахарным диабетом 2 типа положительно коррелировала с уровнем глюкозы в крови и содержанием гликированного гемоглобина. Уровень триглицеридов отрицательно связан с интенсивностью индуцированного НСТ-теста моноцитов и процентным содержанием внеклеточных нейтрофильных ловушек [6].

Цель настоящей работы — оценка состояния функциональной активности нейтрофилов и моноцитов у больных сахарным диабетом 2 типа с синдромом диабетической стопы.

Материалы и методы

При проведении работы обследованы 14 больных сахарным диабетом 2 типа с синдромом диабетической стопы и 22 человека из группы сравнения. Критерии включения в основную группу: сахарный диабет 2 типа со стажем болезни не менее 1 года, согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: злокачественные новообразования любой локализации, цирроз печени, психические заболевания, острые инфекции, травмы или оперативные вмешательства в течение последних 6 месяцев, использование больными иммуномодуляторов и вакцин в течение последних 6 месяцев. Поскольку пациенты с сахарным диабетом также страдали артериальной гипертензией и/или ишемической болезнью сердца, в группу сравнения были включены пациенты с этими нозологиями, которые имели нормальный уровень глюкозы крови. Обследование проводилось на вторые сутки после поступления. Возраст больных составил $60,57 \pm 2,29$ года в основной группе и $61,68 \pm 2,83$ года — в группе сравнения. У обследуемых людей исследовали функциональную активность нейтрофилов и моноцитов: количество клеток, способность к фагоцитозу частиц латекса, уровень выработки активных форм кислорода по НСТ-тесту (спонтанному и стимулированному), лизосомальную активность. В выделенных чистых фракциях моноцитов и нейтрофилов определяли способность клеток к формированию внеклеточных ловушек. Этот показатель исследовали в спонтанном варианте и после стимуляции пирогеналом [7]. По методу, описанному в [8], оценивали способность эффекторов врожденного иммунитета к адгезии по относительной доле фиксированных клеток (активность адгезии) и размерам клеток, которые определяли с помощью окуляр-микрометра. Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных статистических программ SPSS. Данные представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали непараметрические критерии Манна-Уитни (U), Колмогорова-Смирнова (KS) и Вальда-Вольфовица (WW). При сравнении связанных переменных применяли парный критерий Вилкоксона (PKW). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [9].

Результаты и обсуждение

Содержание глюкозы в сыворотке крови составило $4,42 \pm 0,10$ ммМ/л в группе сравнения и $12,00 \pm 0,79$ ммМ/л — у пациентов с сахарным диабетом ($p = 0,001$, KS). Это указывает на нормальный углеводный обмен у лиц из группы сравнения и недостаточно эффективный контроль гликемии у людей, страдающих синдромом диабетической стопы. Индекс массы тела был равен $26,84 \pm 1,09$ кг/м² в группе сравнения и $28,79 \pm 2,39$ кг/м² у больных с синдромом диабетической стопы. Различия были статистически значимыми ($p = 0,001$ U). Данные указывают на наличие избыточной массы тела в стадии предожирения у лиц из обеих групп.

Количество нейтрофилов в крови демонстрировало тенденцию к увеличению и составило $7,11 \pm 0,54 \times 10^9$ /л в группе сравнения и $8,40 \pm 0,80$ в группе пациентов с диабетической стопой. Наличие синдрома диабетической стопы сопровождалось увеличением уровня палочкоядерных нейтрофилов до $5,25 \pm 1,37$ % (в группе сравнения $2,73 \pm 0,91$ %, $p = 0,04$, U). При этом содержание лимфоцитов статистически значимо снижалось с $16,91 \pm 1,10$ % в группе сравнения до $12,0 \pm 1,20$ % ($p = 0,016$, U). Наличие элементов сдвига лейкоцитарной формулы влево, при отсутствии статистически значимого лейкоцитоза, можно рассматривать как свидетельство наличия воспалительного очага при синдроме диабетической стопы.

При изучении состояния нейтрофилов в цельной крови было установлено, что $2,65 \pm 1,36$ % нейтрофилов лиц из группы сравнения формировали внеклеточные ловушки. Наличие синдрома диабетической стопы вызывает статистически значимое снижение этого показателя до $0,29 \pm 0,13$ % ($p = 0,037$, U). Стимуляция клеток пирогеналом вызывала разнонаправленную реакцию: в группе сравнения показатель демонстрировал только тенденцию к уменьшению и составил $2,10 \pm 0,91$ %. Под действием пирогенала возросла функциональная активность и $0,57 \pm 0,20$ % нейтрофилов больных сахарным диабетом образовывали внеклеточные ловушки, различия со спонтанным уровнем оказались статистически значимыми ($p = 0,046$, PKW). При этом, несмотря на выраженную разницу уровня клеток, формирующих внеклеточные ловушки после стимуляции, статистической значимости они не достигли. Внеклеточные ловушки формируются эффекторными клетками врожденного иммунитета за счет выброса за пределы цитоплазматической мембраны петель из собственной ДНК. Ло-

вушки обеспечивают фиксацию микроорганизмов, высокоэффективный киллинг и разрушение чужеродных агентов за счет высокой концентрации бактерицидных субстанций. Наши данные свидетельствуют, что нейтрофилы больных с синдромом диабетической стопы сохраняют способность положительно реагировать на дополнительную стимуляцию, но при этом относительное количество образованных внеклеточных ловушек меньше, чем в группе сравнения.

Как видно на рисунке, нейтрофилы больных сахарным диабетом с синдромом диабетической стопы в чистой фракции формировали меньше внеклеточных ловушек, чем клетки лиц из группы сравнения. Однако эти различия не достигли статистической значимости. Относительная доля моноцитов, продуцировавших внеклеточные ловушки, при синдроме диабетической стопы была значимо меньше — в 1,86 раза ($p = 0,040$, U). После стимуляции пирогеналом сохранилась только тенденция к уменьшению способности формировать внеклеточные ловушки.

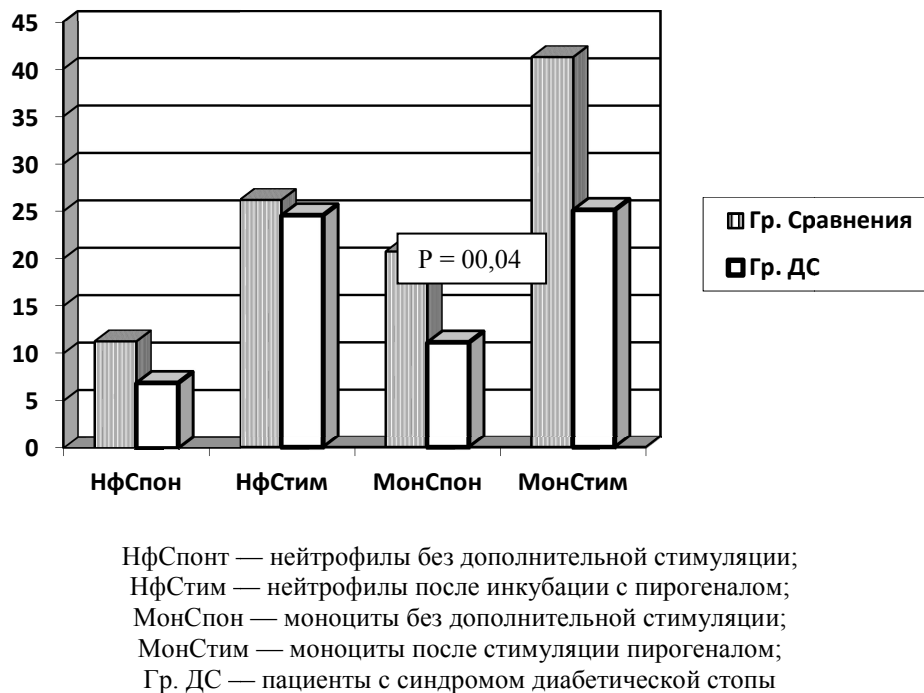


Рисунок. Количество клеток (%), формирующих внеклеточные ловушки в чистой фракции

Обращает на себя внимание тот факт, что в обеих группах отмечалась позитивная реакция на стимуляцию пирогеналом, и доля клеток, формировавших внеклеточные ловушки, повышалась статистически значимо как для нейтрофилов, так и для моноцитов. Однако степень прироста в группе сравнения составила 2,32 для нейтрофилов и 1,99 для моноцитов. Аналогичный показатель для больных с синдромом диабетической стопы составил 3,57 и 2,56 соответственно. Таким образом, синдром диабетической стопы обуславливает тенденцию к увеличению реактивности клеток на дополнительную стимуляцию.

Как видно из таблицы, способность моноцитов к поглощению чужеродных частиц в обеих изучаемых группах практически не различалась. Способность моноцитов к выработке активных форм кислорода статистически значимо возрастала у пациентов с синдромом диабетической стопы. Активность спонтанного НСТ-теста была выше при наличии диабетической стопы в 1,48 раза, а интенсивность спонтанного НСТ-теста была выше, чем в группе сравнения в 1,65 раза. После инкубации клеток с частицами латекса в качестве дополнительной стимуляции наблюдаемая картина не изменилась: активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста также статистически значимо выше в группе пациентов с синдромом диабетической стопы в 1,89 и 1,81 раза соответственно.

Дополнительно был рассчитан функциональный резерв как соотношение активности или интенсивности индуцированного и спонтанного вариантов НСТ-теста. Функциональный резерв моноцитов был статистически значимо выше в группе пациентов с синдромом диабетической стопы, что указывает на повышенную способность моноцитов активироваться под действием дополнительного стимула.

Функциональная активность нейтрофилов и моноцитов у пациентов с синдромом диабетической стопы

Показатель	Группа сравнения	Группа пациентов с синдромом диабетической стопы	<i>P</i>
Моноциты			
Активность фагоцитоза (%)	51,09 ± 2,99	50,00 ± 3,12	> 0,05
Интенсивность фагоцитоза (у.е.)	1,37 ± 0,13	1,42 ± 0,18	> 0,05
Фагоцитарное число (у.е.)	2,55 ± 0,13	2,80 ± 0,26	> 0,05
Активность спонтанного НСТ-теста (%)	16,05 ± 1,88	23,75 ± 5,34	0,024 WW
Интенсивность спонтанного НСТ-теста (у.е.)	0,191 ± 0,023	0,315 ± 0,081	0,024 WW
Активность индуцированного НСТ-теста (%)	12,32 ± 1,86	23,25 ± 3,90	0,019 U
Интенсивность индуцированного НСТ-теста (у.е.)	0,156 ± 0,024	0,283 ± 0,055	0,035 U
Функциональный резерв (по активности)	0,780 ± 0,092	1,067 ± 0,103	0,008 WW
Функциональный резерв (по интенсивности)	0,838 ± 0,118	0,996 ± 0,109	0,000 WW
Нейтрофилы			
Активность фагоцитоза (%)	45,27 ± 3,39	42,50 ± 1,95	> 0,05
Интенсивность фагоцитоза (у.е.)	1,07 ± 0,13	1,48 ± 0,23	> 0,05
Фагоцитарное число (у.е.)	2,35 ± 0,14	3,45 ± 0,48	0,007 U
Активность спонтанного НСТ-теста (%)	27,55 ± 2,88	19,50 ± 3,27	> 0,05
Интенсивность спонтанного НСТ-теста (у.е.)	0,485 ± 0,057	0,345 ± 0,040	> 0,05
Активность индуцированного НСТ-теста (%)	25,82 ± 2,32	20,00 ± 2,45	> 0,05
Интенсивность индуцированного НСТ-теста (у.е.)	0,432 ± 0,052	0,285 ± 0,031	> 0,05
Функциональный резерв (по активности)	1,06 ± 0,10	1,14 ± 0,13	> 0,05
Функциональный резерв (по интенсивности)	1,02 ± 0,15	0,832 ± 0,039	0,008 WW

При оценке состояния нейтрофилов было обнаружено, что фагоцитарное число статистически значимо выше у лиц с синдромом диабетической стопы относительно группы сравнения в 1,47 раза (табл.). Показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста демонстрировали тенденцию к снижению в группе пациентов с сахарным диабетом. При этом функциональный резерв нейтрофилов, рассчитанный по интенсивности, статистически значимо снизился и составил 81,6 % относительно группы сравнения. Результаты указывают на снижение способности нейтрофилов увеличивать выработку активных форм кислорода при дополнительной стимуляции.

Выводы

1. Синдром диабетической стопы сопровождается ингибированием способности нейтрофилов и моноцитов формировать внеклеточные ловушки в цельной крови и чистой фракции клеток.
2. Моноциты больных с синдромом диабетической стопы характеризуются сохраненной способностью к фагоцитозу и увеличенной выработкой активных форм кислорода как в спонтанном варианте НСТ-теста, так и при дополнительной стимуляции частицами латекса.
3. У нейтрофилов пациентов с синдромом диабетической стопы увеличена способность к фагоцитозу и снижена выработка активных форм кислорода при стимуляции частицами латекса.
4. Синдром диабетической стопы у больных сахарным диабетом определяет формирование дисбаланса в состоянии эффекторных клеток системы врожденного иммунитета.

Список литературы

- 1 Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030 // *Diabetes Care*. — 2004. — Vol. 27. — P. 1047–1053.
- 2 Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. — М., 2011. — 115 с.
- 3 Gallacher S.J., Thomson G., Fraser W.D. et al. Neutrophil bactericidal function in diabetes-mellitus — evidence for association with blood-glucose control // *Diabetic Medicine*. — 1995. — Vol. 12, Iss. 10. — P. 916–920.
- 4 Nielson C.P., Hindson D.A. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro // *Diabetes*. — 1989. — Vol. 38, No. 8. — P. 1031–1035.

- 5 Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л., Колесникова А.А., Абрамовских О.С. Оценка показателей липидного обмена и функционального состояния иммунной системы у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от выраженности поздних осложнений // Вестн. Челябинского гос. ун-та. — 2013. — № 7 (298). Биология. — Вып. 2. — С. 204–205.
- 6 Долгушин И.И., Тарабрина Ю.О., Колесников О.Л. и др. Оценка взаимосвязей между показателями углеводного и липидного обмена и активностью иммунной системы у больных сахарным диабетом 2 типа // Вестн. Уральской мед. академич. науки. — 2012. — № 2 (39). — С. 31–32.
- 7 Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. — М.: РАМН, 2009. — 208 с.
- 8 Зурочка А.В. Иммунобиологические свойства секреторных продуктов нейтрофилов (нейтрофилокинов): Дис. ... д-ра мед. наук. — Челябинск, 1991. — 231 с.
- 9 Наследов А.Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных. — СПб.: Питер, 2008. — 416 с.

И.И.Долгушин, Ю.О.Тарабрина, О.Л.Колесников, А.А.Колесникова

Диабеттік өкше синдромымен аура тындардың туа біткен иммунитет торының функциялық күйі

Мақалада 2 үлгідегі диабеттік өкше синдромына шалдыққан 14 емделуші және салыстырмалы тобынан 22 адам зерттеуінің нәтижелері келтірілген. Диабеттік өкше синдромымен аурулардың нейтрофилдерінің пайыздық саны 9,1 төмендеген және моноциттарының саны 9,6 % азайтылған. Диабеттік өкше синдромының кездестіргенде, моноциттардың оттектің белсенді пішінінің өндіріуі төмендейді (НСТ-тест нәтижесі бойынша). Аурудың осындай түріне шалдыққан нейтрофилдердің фагоцитозын белсендіруі көрсетілген (фагоцитарлық саны 40,8 % өсті), бірақ олар сыртқы ынталарға реакцияны азайтуын көрсетті. Сонымен, диабеттік өкше синдромы тумыстан иммунитеттің жүйесінде тепе-теңсіздіктің дамуын анықтады.

I.I.Dolgushin, Yu.O.Tarabrina, O.L.Kolesnikov, A.A.Kolesnikova

Functional state of cells in innate immunity in treatment-off with diabetic foot syndrome

14 patients with type 2 diabetes with diabetic foot syndrome and 22 patients from the comparison group are examined. In patients with diabetic foot syndrome the percentage of neutrophils able to form extracellular traps in whole blood is reduced in 9.1 times and the number of monocytes that form the extracellular traps is decreased by 9.6 %. In the presence of diabetic foot syndrome it was found that ability of monocytes to produce active oxygen forms (according to the NBT-test results) with preserved function of the absorption of alien objects is reduced. Neutrophils of patients with diabetic foot syndrome demonstrated the activation of phagocytosis (phagocytic number increased by 40.8 %), but it had reduced severity of response to external stimuli. Thus, diabetic foot syndrome determines the development of the imbalance in the innate immune system.

References

- 1 Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. *Diabetes Care*, 2004, 27, p. 1047–1053.
- 2 *Algorithms of specialized medical care to patients with diabetes mellitus*, Moscow, 2011, p. 115.
- 3 Gallacher S.J., Thomson G., Fraser W.D. et al. *Diabetic Medicine*, 1995, 12(10), p. 916–920.
- 4 Nielson C.P., Hindson D.A. *Diabetes*, 1989, 38(8), p. 1031–1035.
- 5 Tarabrina Yu.O., Kolesnikov O.L., Kolesnikova A.A., Abramovskih O.S. *Bulletin of the Chelyabinsk State University*, 2013, 7(298), Biology, 2, p. 204–205.
- 6 Dolgushin I.I., Tarabrina Yu.O., Kolesnikov O.L. et al. *Journal of Ural medical academic science*, 2012, 2(39), p. 31–32.
- 7 Dolgushin I.I., Andreyeva Yu.S., Savochkina A.Yu. *Neutrophil traps and methods for evaluating the functional status of neutrophils*, Moscow: Russian Academy of medical sciences, 2009, p. 208.
- 8 Zurochka A.V. *Immunobiological properties of secretory products of neutrophils (nejtrofiliokinov)*: Dissertation, Chelyabinsk, 1991, p. 231.
- 9 Nasledov A.D. *SPSS 15: professional statistical analysis of data*, St. Petersburg: Piter, 2008, 416 p.

С.В.Андреева¹, Д.Ю.Нохрин¹, Л.И.Бахарева^{1,2}

¹Челябинский государственный университет;
²Городская клиническая больница № 6, Челябинск, Россия
(E-mail: andreeva_sv81@mail.ru)

Оценка степени экологической общности микроорганизмов, выделенных из ожоговых ран

В статье с использованием методов микробной экологии (индексы сходства Жаккара и Раупа-Крика, анализ главных координат) выявлены ассоциации микроорганизмов в ожоговых ранах. Показано, что устойчивые ассоциации могут сформироваться в результате антибиотикотерапии и антагонистических взаимоотношений между экологическими группами микроорганизмов. Представлены экспериментальные данные, дано их обсуждение.

Ключевые слова: термический агент, ожоговая рана, стационар, микрофлора, первая помощь, *E. coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, антибиотикотерапия, инфекции, экологическая ниша.

Воздействие высокой температуры при ожогах пламенем и при контакте с термическим агентом способно «стерилизовать» рану. По мере пребывания больного в стационаре ожоговая рана контаминируется микрофлорой, при этом скорость заселения зависит от многих факторов: места получения травмы, способа оказания первой помощи, локализации ожога, наличия госпитальных возбудителей и т.д. [1].

По результатам исследований, проведённых нами ранее, приоритетными микроорганизмами, выделяющимися из ран пациентов Челябинского областного ожогового центра, являлись *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [2]. Высокая этиологическая значимость данных микроорганизмов отмечается и в работах других исследователей, что позволяет считать их основными возбудителями ожоговой инфекции [3–5]. При этом основные возбудители часто встречаются в ассоциациях с различными условно-патогенными микроорганизмами: *E. coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.* и др. [6–8]. Закономерности формирования подобных ассоциаций остаются недостаточно изученными. Вместе с тем выявление причин экологической общности разных микроорганизмов в ожоговых ранах важно для каждого стационара, так как позволяет определить стратегию антибиотикотерапии и противоэпидемиологического режима. Поэтому цель данной работы заключалась в выявлении устойчивых ассоциаций микроорганизмов в ожоговых ранах и объяснении возможных причин их экологической общности.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе бактериологической лаборатории МБУЗ ГКБ № 6 г. Челябинска. Были проанализированы результаты бактериологических посевов пациентов, госпитализированных в Челябинский областной ожоговый центр с января по июнь 2012 г. Всего исследована 341 проба раневого отделяемого.

Для выявления ассоциаций микроорганизмов в ходе статистического анализа использовали расчёт индексов сходства Жаккара C_J и Раупа-Крика C_{R-C} , а для интерпретации ассоциаций полученные матрицы индексов сходства подвергали многомерной ординации методом главных координат. Оценку статистической значимости для C_J проводили с использованием таблиц критических значений [9], а для C_{R-C} рассчитывали как $P = 1 - C_{R-C}$.

Статистически значимыми признавали ассоциации микроорганизмов при $P \leq 0,05$, незначимыми — при $P > 0,10$; в промежуточных случаях ($0,05 < P \leq 0,10$) обсуждали тенденции к ассоциациям. Расчёты и графические построения выполнены в пакете PAST (v. 2.17c) [10].

Результаты и обсуждение

Из 341 пробы в 104 (30,5 %) посев раневого отделяемого не дал роста, т.е. высеваемость микрофлоры составила 69,5 % ($n = 237$). В 176 пробах (51,6 %) возбудитель был представлен монокультурой. В 61 пробе (17,9 %) были выделены ассоциации из 2 и более микроорганизмов, из них

29 проб (48,3 %) содержали смешанные популяции приоритетных микроорганизмов: *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*.

В результате анализа 61 пробы с ассоциациями были рассчитаны показатели экологической общности, которые представлены в таблице.

Т а б л и ц а

**Оценка экологической общности микроорганизмов в ожоговых ранах:
верхняя треугольная матрица — коэффициент Жаккара, нижняя — коэффициент Раупа-Крика**

Микроорганизмы	Микроорганизмы																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	—	0,57	0,11	0	0	0,05	0,03	0,08	0,03	0,03	0,03	0,07	0	0,06	0,06	0	0
2	0,95	—	0,11	0,04	0,02	0,07	0,06	0,15	0,02	0,04	0	0,10	0	0,02	0,04	0,05	0
3	0,69	0,62	—	0	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0,03	0,35	0,36	—	0	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,09	0,22	0,40	0,45	—	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0,01	0	0,15	0,75	0,82	—	0,15	0	0	0,09	0	0,11	0	0	0,08	0	0
7	0,06	0,21	0,28	0,38	0,42	0,88	—	0	0	0,17	0	0	0	0	0	0,14	0
8	0,07	0,53	0,57	0,31	0,36	0,09	0,21	—	0	0	0	0,12	0,11	0	0	0	0,11
9	0,21	0,07	0,34	0,42	0,45	0,27	0,39	0,30	—	0	0	0,08	0	0	0,17	0	0
10	0,42	0,70	0,41	0,45	0,47	0,84	0,91	0,34	0,45	—	0	0	0	0	0	0	0
11	0,72	0,10	0,45	0,48	0,49	0,42	0,45	0,43	0,47	0,48	—	0	0	0	0	0	0
12	0,04	0,02	0,16	0,29	0,34	0,60	0,19	0,66	0,74	0,34	0,41	—	0	0,09	0	0,08	0
13	0,21	0,12	0,45	0,47	0,48	0,41	0,45	0,93	0,48	0,48	0,49	0,41	—	0	0	0	1
14	0,83	0,23	0,41	0,45	0,45	0,35	0,42	0,36	0,45	0,47	0,49	0,82	0,48	—	0	0	0
15	0,41	0,13	0,32	0,39	0,43	0,65	0,35	0,27	0,90	0,44	0,47	0,23	0,46	0,43	—	0	0
16	0,04	0,33	0,37	0,43	0,45	0,27	0,87	0,30	0,43	0,45	0,48	0,73	0,48	0,45	0,40	—	0
17	0,21	0,12	0,46	0,47	0,48	0,42	0,46	0,92	0,47	0,48	0,49	0,42	0,99	0,48	0,47	0,47	—

Примечание. 1 — *Staphylococcus aureus*; 2 — *Pseudomonas aeruginosa*; 3 — *Acinetobacter baumannii*; 4 — *Staphylococcus epidermidis*; 5 — *Staphylococcus saprophyticus*; 6 — *Klebsiella pneumoniae*; 7 — *Enterococcus faecalis*; 8 — *Candida albicans*; 9 — *Pseudomonas fluorescens*; 10 — *Escherichia coli*; 11 — *Corynebacterium sp.*; 12 — *Acinetobacter calcoaceticus*; 13 — *Proteus sp.*; 14 — *Enterobacter aerogenes*; 15 — *Candida tropicalis*; 16 — *Streptococcus pyogenes*; 17 — *Citrobacter freundii*.

Коэффициент Жаккара C_J , наряду с коэффициентом Дайса (Сёренсена, Чекановского-Сёренсена), является одной из наиболее распространённых парных мер сходства в фаунистических, флористических, экологических исследованиях и применяется также в микробной экологии [11]. В контексте данной работы он представляет собой отношение числа проб, содержащих одновременно два микроорганизма, к числу проб, содержащих хотя бы один из этих двух микроорганизмов. Таким образом, $C_J = 0$ указывает на отсутствие совместной встречаемости организмов, а $C_J = 1$ — на исключительно совместную встречаемость двух организмов. С помощью данного коэффициента удалось выявить только одну статистически значимую ассоциацию: *S. aureus* и *P. aeruginosa* ($C_J = 0,57$; $P = 0,001$).

Коэффициент Раупа-Крика C_{R-C} является вероятностной мерой сходства. Он рассчитывается с использованием рандомизационной процедуры Монте-Карло на основе сравнения наблюдаемого числа случаев совместного присутствия организмов в пробе с распределением их совместной встречаемости в 1000 случайным образом сгенерированных выборках из данных по обоим видам. Поскольку C_{R-C} представляет собой вероятность неслучайной ассоциации организмов, оценку статистической значимости для него можно вычислить как $P = 1 - C_{R-C}$. С помощью данного коэффициента удалось выявить 2 статистически значимые ассоциации: *Proteus sp.* и *Citrobacter freundii* ($C_{R-C} = 0,99$; $P = 0,008$) и *S. aureus* и *P. aeruginosa* ($C_{R-C} = 0,95$; $P = 0,048$). Также была обнаружена тенденция к ассоциациям следующих микроорганизмов: *C. albicans* и *Proteus sp.* ($C_{R-C} = 0,93$; $P = 0,069$), *C. albicans* и *Citrobacter freundii* ($C_{R-C} = 0,92$; $P = 0,080$), *Enterococcus faecalis* и *E. coli* ($C_{R-C} = 0,91$; $P = 0,092$), *Pseudomonas fluorescens* и *Candida tropicalis* ($C_{R-C} = 0,90$; $P = 0,098$).

Для визуализации обнаруженных ассоциаций и объяснения возможных причин экологической общности микроорганизмов, относящихся к разным таксонам, использовали многомерный анализ.

Анализ главных координат (многомерное метрическое шкалирование) представляет собой одну из техник непрямого градиентного анализа в экологии [12], родственную анализу главных компонент. Если в качестве меры сходства между показателями используется корреляция Пирсона, то результаты анализа главных координат будут аналогичны методу главных компонент. Однако в анализе главных координат можно использовать и другие меры сходства (в нашем случае — индексы Жаккара, Раупа-Крика и др.), тогда как выделенные в его результате оси (главные координаты, ГК) интерпретируются аналогично главным компонентам.

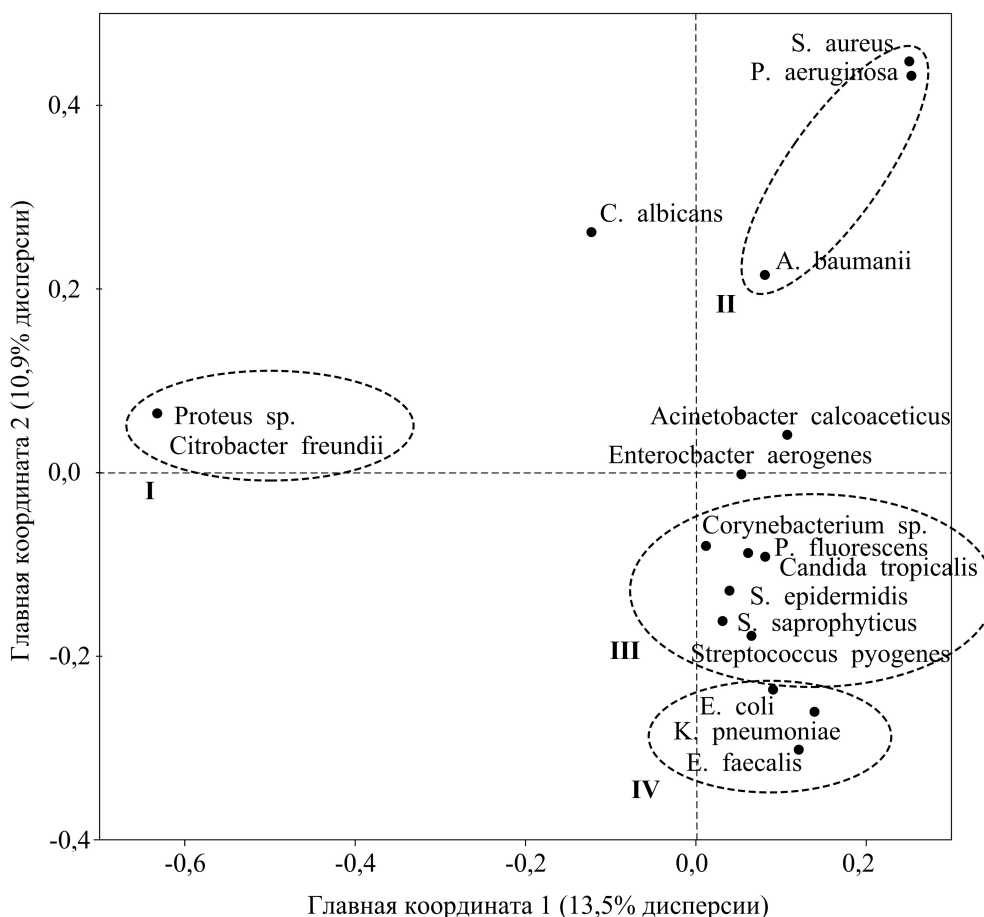


Рисунок. Микроорганизмы в пространстве двух первых координат, выделенных с использованием коэффициента сходства Жаккара

В ходе анализа главных координат было установлено, что данные слабо подвергались обобщению: даже на первую главную координату (ГК 1) приходилось только 13,5 % общей изменчивости совместного распределения микроорганизмов. Это указывает на существование большого числа факторов, специфически влияющих на микробный пейзаж.

На рисунке таксоны микроорганизмов представлены в пространстве двух первых координат, выделенных с использованием индекса сходства Жаккара (результаты с использованием индекса Раупа-Крика аналогичны и не приводятся). Объекты, находящиеся по разные стороны от нулевого значения, обнаруживают отрицательную связь, по одну сторону — положительную. Из рисунка видно, что все исследованные таксоны микроорганизмов распределились на 4 основных группы, для которых были характерны высокие коэффициенты экологической общности (обведены пунктиром). В группу I вошли представители кишечной микрофлоры, в группу II — приоритетные возбудители ожоговой инфекции, III — представители кожной микрофлоры, IV — предположительно, госпитальная флора фекального происхождения.

Вдоль ГК 1 проявилась отрицательная связь группы I со всеми остальными. Вошедшие в неё *Proteus sp.* и *Citrobacter freundii* являются представителями кишечной микрофлоры, которая заселяет поверхность ожоговых ран в первые дни после ожога [1]. Таким образом, ГК 1, вероятно, отражает

временную динамику смены микробного пейзажа, когда первичные контаминанты раны замещаются на госпитальную микрофлору. Следовательно, выявленная устойчивая ассоциация *Proteus sp.* и *Citrobacter freundii* может маркировать пробы, собранные на ранних сроках госпитализации.

Вдоль ГК 2 отчётливо разделились группы, включающие представителей кожной микрофлоры (III), госпитальной микрофлоры фекального происхождения (IV) и приоритетных возбудителей ожоговой инфекции (II). Полагаем, что ГК 2 отражает смену микробного пейзажа в процессе антибиотикотерапии. Действительно, стандартная схема ведения ожоговых больных предполагает использование β -лактамов антибиотиков в качестве стартовой терапии. Эти антибиотики эффективно подавляют в первую очередь кожную микрофлору (группа III), но остаются неэффективными в отношении микроорганизмов группы IV [13]. Поэтому на следующем этапе лечения пациентам назначают карбапенемы, которые ингибируют рост представителей группы IV. В результате такого лечения в ожоговой ране создаётся оптимальная среда для размножения устойчивых к β -лактамам и карбапенемам микроорганизмов, сформировавших группу II. Таким образом, логичное объяснение получает устойчивая ассоциация *Enterococcus faecalis* и *E. coli*. Её представителей объединяет резистентность к β -лактамам: для *E. faecalis* характерна природная устойчивость к антибиотикам, обусловленная наличием хромосомной кассеты генов полирезистентности, а для *E. coli* — приобретённая, обусловленная наличием β -лактамаз расширенного спектра. Наиболее сильная и высоко статистически значимая ассоциация *S. aureus* и *P. aeruginosa* также формируется в результате антибиотикотерапии, оставляющей в ране полирезистентные штаммы указанных бактерий. Это объясняет высокий процент высеваемости именно этих видов микроорганизмов на протяжении ряда лет [14]. Интересной особенностью является близость *Candida albicans* к экологической группе II. Этот факт можно объяснить тем, что при использовании системной антибактериальной терапии грибы занимают освободившуюся от бактерий экологическую нишу.

Не исключено, что взаимоотношения между выделенными группами микроорганизмов определяются не только антибиотикотерапией, но и являются результатом антагонизма. Так и у *S. aureus*, и у *P. aeruginosa* установлена способность продуцировать бактериоцины, ингибирующие рост представителей кишечной и кожной микрофлоры. В свою очередь для *E. coli*, *K. pneumoniae* и *C. freundii* также характерна способность к бактериоциногенности. Считается, что выход бактериоцинов зависит, прежде всего, от показателей плотности культуры-продуцента и далее регулируется собственной сигнальной системой — чувством кворума (quorum-sensing systems, Qs). Чувство кворума позволяет популяциям бактерий коллективно регулировать экспрессию генов и синхронизировать поведение группы, являясь своего рода «нейронной» сетью бактерий [15]. Таким образом, нерациональная антибиотикотерапия может привести к избыточному размножению антибиотикорезистентных штаммов, которые не только способны вызвать инфекцию, но и за счет массовой секреции бактериоцинов подавить рост популяции других бактерий, занимающих эту же экологическую нишу.

Выводы

1. С использованием методов микробной экологии в ожоговых ранах выявлены устойчивые ассоциации микроорганизмов, причем на долю популяции приоритетных микроорганизмов (*S. aureus*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*) приходилось 48,3 % от всех ассоциаций.

2. Представители разных экологических общностей редко обнаруживались совместно, что может быть следствием антимикробной терапии и/или свидетельством антагонистического характера взаимоотношений между исследованными группами бактерий.

Список литературы

- 1 Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Яковлев В.П. Ожоговая инфекция. Этиология, патогенез, диагностика, профилактика и лечение. — М.: Вузовская книга, 2010. — 416 с.
- 2 Андреева С.В., Бахарева Л.И., Нохрин Д.Ю. Видовой состав микрофлоры ожоговых ран // Вестн. Челябинского гос. ун-та. — 2013. — № 7 (298), Биология, Вып. 2. — С. 58–59.
- 3 Keen E.F. Incidence and bacteriology of burn infections at a military burn center // Burns. — 2010. — Vol. 36. — P. 461–468.
- 4 Kiuru V., Anttila V., Vuola J. Eradication of *Acinetobacter baumannii* Outbreak at a Burn Centre // Supplement to Journal of Burn Care and Research. — 2012. — Vol. 33, No. 2. — P. 15.
- 5 Wong T.H., Tan B.H., Ling M.L., Song C. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* on a burns unit — clinical risk factors and prognosis // Burns. — 2002. — Vol. 28, No. 4. — P. 340–349.

- 6 Шамаева С.Х., Миронов С.Х., Потепов А.Ф., Петрова К.М., Евграфов С.Ю. Микрофлора ожоговых ран и её чувствительность к антибиотикам у детей с ожоговой болезнью // Человек и его здоровье: Курский науч.-практ. вестн. — 2011. — № 2. — С. 91–95.
- 7 Iman A. Hussien, Khalid A. Habib, Kifah A. Jassim. Bacterial Colonization of Burn Wounds // J. Baghdad for Sci. — 2012. — No. 4. — P. 623–631.
- 8 Nagoba B.S., Deshmukh S.R., Wadher B.J., Pathan A.B. Bacteriological analysis of burn Sepsis // Indian J. Med. Sci. — 1999. — Vol. 53, No. 5. — P. 216–219.
- 9 Real R. Tables of Significant Values of Jaccard's Index of Similarity // Miscellanea Zoologica. — 1999. — Vol. 22, No. 1. — P. 29–40.
- 10 Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // Palaeontologia Electronica. — 2001. — Vol. 4, No. 1. — P. 9.
- 11 Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology // FEMS Microbiol. Ecol. — 2007. — Vol. 62, No. 2. — P. 142–160.
- 12 Legendre P., Legendre L. Numerical Ecology. — Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998. — 853 p.
- 13 Андреева С.В., Бахарева Л.И., Шафикова Н.Э., Попова М.А., Угнивенко М.И. Особенности антибиотикочувствительности этиологически значимой микрофлоры пациентов ожоговой реанимации / Тезисы XI междунар. конгресса МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии. — 2009. — Т. 11, № 4. — С. 9–10.
- 14 Андреева С.В., Бахарева Л.И., Валеева Д.М. Динамика антибиотикорезистентности у ведущих возбудителей ожоговых инфекций // Вестн. Челябинского гос. ун-та. — 2013. — № 7(298), Биология, Вып. 2. — С. 60–61.
- 15 Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Бактериоцины: их биологическая роль и тенденции применения // Исследовано в России: Электронный науч. журн. — С. 164–198. — URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>

С.В.Андреева, Д.Ю.Нохрин, Л.И.Бахарева

Күйік жараларынан алынған микроағзалар тұтастығының экологиялық дәрежесін сараптау

Микробтық экологияның әдістерін пайдаланып (Жаккар және Рауп-Криктің ұқсастық индекстері, басты координаттар талдауы), күйік жараларында микроағзалардың ассоциациялары айқындалған. Мақалада микроағзалардың экологиялық топтарының арасында антибиотиктерапия және антагонистік қарым-қатынастардың нәтижесінде төзімді ассоциациялар пайда болатындығы көрсетілген. Эксперименттік деректерлер ұсынылып, оларға талдау жүргізілген.

S.V.Andreyeva, D.Yu.Nokhrin, L.I.Bakhareva

Assessment of degree of the ecological community of microorganisms, allocated from the burn wounds

Microorganism associations were identified in burn wounds with the use of the microbial ecology (Jaccard's and Raup-Crick's index of similarity, principal coordinate analysis). It was shown that tolerant associations may be formed as a result of antibiotic therapy and antagonistic relationships between ecological groups of microorganisms. Experimental data are presented, their discussion is given.

References

- 1 Alekseyev A.A., Krutikov M.G., Yakovlev V.P. *Burn infection. Etiology, patogeneze, diagnostics, prevention and treatment*, Moscow: Vuzovskaya kniga, 2010, 416 p.
- 2 Andreyev S.V., Baharev L.I., Nokhrin D.Yu. *Bulletin of the Chelyabinsk State University*, 2013,7(298), Biology, 2, p. 58–59.
- 3 Keen E.F. *Burns*, 2010, 36, p. 461–468.
- 4 Kiuru V., Anttila V., Vuola J. *Supplement to Journal of Burn Care and Research*, 2012, 33(2), p. 15.
- 5 Wong T.H., Tan B.H., Ling M.L., Song C. *Burns*, 2002, 28(4), p. 340–349.
- 6 Shamayeva S.Kh., Mironov S.Kh., Potepov A.F., Petrova K.M., Evgrafov S.Yu. *Human beings end health*, 2011, 2, p. 91–95.
- 7 Iman A. Hussien, Khalid A. Habib, Kifah A. Jassim. *J. Baghdad for Sci.*, 2012, 4, p. 623–631.
- 8 Nagoba B.S., Deshmukh S.R., Wadher B.J., Pathan A.B. *Indian J. Med. Sci.*, 1999, 53(5), p. 216–219.
- 9 Real R. *Miscellanea Zoologica*, 1999, 22(1), p. 29–40.
- 10 Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 4(1), p. 9.
- 11 Ramette A. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, 62(2), p. 142–160.
- 12 Legendre P., Legendre L. *Numerical Ecology*, Amsterdam: Elsevier Science BV, 1998, 853 p.

13 Andreyeva S.V., Bakhareva L.I., Shafikova N.E., Popova M.A., Ugnivenko M.I. *Theses of the XI international congress of MAKMAX/ESCMID on antimicrobial therapy*, 2009, 11(4), p. 9–10.

14 Andreyeva S.V., Bakhareva L.I., Valeyeva D.M. *Bulletin of the Chelyabinsk State University*, 2013, 7(298), Biology, 2, p. 60–61.

15 Pokhilenko V.D., Pereygin V.V. *It is Investigated in Russia*, p. 164–198, <http://zhurnal.apc.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>

С.В.Беляева¹, А.Л.Бурмистрова¹, Д.С.Сташкевич¹, Т.А.Суслова², И.П.Ананьева³

¹Челябинский государственный университет;

²Челябинская областная станция переливания крови;

³Противотуберкулезный диспансер № 3, Челябинск, Россия

Полиморфизмы гена TNF α (-308 и -238) у больных туберкулезом легких представителей русской популяции Челябинской области

В статье отмечено, что для определения взаимосвязи между SNPs гена TNF и предрасположенностью к туберкулезу впервые было проведено генотипирование частоты встречаемости SNPs -308 G/A TNF α и -238 G/A у больных туберкулезом легких представителей русской популяции Челябинской области. Установлено, что развитие возникшей инфекции *M. tuberculosis* в значительной степени обуславливается наследуемыми факторами предрасположенности к туберкулезу. Показано, что аллель TNF-238*A, генотип TNF-238*G/A и гаплотип -308G/-238A являются факторами предрасположенности к туберкулезу легких в русской популяции Челябинской области.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, иммунная система, микобактерии, гранулемы, инфекционные локусы, ген TNF α , аллелей, генотипов и гаплотипов.

Туберкулез является одной из наиболее социально значимых инфекций. Рассматривая проблему туберкулеза на молекулярном и клеточном уровнях, вероятно, нельзя четко разграничить значение биологических свойств *M. tuberculosis* и иммунной системы макроорганизма. Исследование генетических основ подверженности туберкулезу — одна из наиболее активно разрабатываемых в настоящее время проблем. На данный момент выявлен ряд генетических маркеров повышенной чувствительности к туберкулезной инфекции — дефекты генов системы воспаления: рецептора IFN γ , генов IL12, TNF α , IL10, IL1, генов иммунного ответа: HLA, TLR, а также системы метаболизма: VDR, NRAMP [1].

TNF α — основной цитокин в противотуберкулезном иммунитете, так как в синергизме с IFN γ участвует в формировании и поддержании гранулемы. Низкая продукция TNF α недостаточна для активизации макрофагов до того уровня, когда они способны убивать микобактерии и/или формировать гранулемы, отграничивающие инфекционные локусы [2]. Повышенная продукция TNF α усиливает прогрессирование туберкулеза через локальные повреждения тканей и повышает вирулентность самих микобактерий. Установлено, что повышенное, в сравнении с нормой, количество TNF α усиливает рост *M. tuberculosis* в альвеолярных макрофагах больных. По мнению тех же авторов, микобактерии «преднамеренно» усиливают продукцию TNF α инфицированными макрофагами для «привлечения» к очагу инфекции неинфицированных макрофагов, затем индуцируют апоптоз инфицированных макрофагов и распространяются по неинфицированным макрофагам [3]. Избыток TNF α приводит к альтерации ткани. То, какую роль играет TNF α при туберкулезе (протективную или деструктивную), зависит, по-видимому, от его количественного содержания в тканях: слишком высокая продукция вызывает выраженные воспалительные изменения в легких, а недостаток TNF α снижает иммунный надзор организма, что сопровождается глубокой дисрегуляцией иммунного ответа, нарушением процесса гранулемообразования, неспособностью контролировать рост *M. tuberculosis*, вследствие чего могут развиваться тяжелые, остро прогрессирующие формы туберкулеза легких [4].

Ген TNF α расположен на 6 хромосоме в локусе, внутри кластера генов III класса HLA между HLA B и HLA DR генами в позиции 6p23-q12 и находится в неравновесном сцеплении с генами HLAII класса. Ген TNF α является одним из самых полиморфных генов цитокинов. Его промоторно-энхансерная область содержит от 9 до 13 полиморфных сайтов типа SNPs. Однако наиболее значимые для человека — это замены гуанина на аденин в положениях -308 и -238. Позиции -308 и -238 приходятся на промотор, что сказывается на возможности транскрипционных факторов связываться с этой частью гена и, таким образом, влиять на скорость транскрипции [5]. Данные нуклеотидные замены — явление достаточно распространенное, к примеру, среди европейцев около 27–33 % в своем генотипе содержат полиморфный (редкий) аллель TNF α -308*A и около 7–10 % — редкий аллель TNF α -238*A. Аллель TNF α -308*A является более сильным активатором транскрипции с 6–7-кратным повышением индуцируемого уровня транскрипции гена TNF α [6]. Наряду с этим для

другого полиморфного варианта гена TNF α -238, аллель А ассоциирован с понижением продукции TNF α [5].

Исследования, посвященные связи генотипа TNF α с инфекционным процессом, вызванным микобактериями, дали противоречивые результаты. Полиморфный аллель TNF α -308*А является фактором риска при туберкулезе у башкир [7] и среди азиатов [8]. В исследованиях Correa P. et al. обнаружена ассоциация с заболеванием туберкулезом низкопродуктивных аллелей TNF α -308*G и TNF α -238*А и доказана протективная роль гаплотипа TNF α -308*А/ -238*G в развитии данного заболевания в Колумбии [9]. TNF α -308*А полиморфизм отмечен как протективный против туберкулеза в Сицилии [10], но не ассоциирован с заболеванием в исследованиях в Турции [11] и Камбодже [12]. По данным мета-анализа, проведенного Z.Zhang et al., не обнаружена ассоциация TNF α -238*G/А с туберкулезом [13].

В исследованиях Selvaraj обнаружено, что варианты -238*А и -308*А сами по себе не только не играют никакой роли в развитии туберкулеза, но даже оказывают протективное действие в сочетании с вариантом гена HLA В*17[14]. Однако автор отмечает, что сочетание соответствующих гаплотипов защищает человека от развития легочного туберкулеза только на первых этапах заболевания. На стадии иммунного ответа наличие подобного гаплотипа у пациентов способствует ухудшению состояния и возникновению рецидивов.

До сих пор остается дискуссионным вопрос, находится ли феномен ассоциации с заболеваниями под прямым влиянием SNPs различных генов или связан с включением в этот процесс «функционально молчащих» генов при условии неравновесного сцепления с аллелями генов HLA системы. Ген TNF α расположен на 6 хромосоме в локусе, внутри кластера генов III класса MHC, между HLA В и HLA DRB1 генами. Известно существование неравновесного сцепления между редким аллелем — 308*А TNF α и DRB1*03 [14]. Небольшое число исследований посвящено комплексному изучению возможного сцепления между генами HLA I, II и III классов. Все они указывают на то, что ассоциации вариантов иммунорегуляторных генов с заболеваниями отражают их сцепление с генами HLA. Установлено достоверное неравновесное сцепление между геном HLA DRB1 и полиморфизмом TNF α -308G-А, что свидетельствует о необходимости анализа параметров неравновесного сцепления между TNF α и локусами HLA II, лежащего в основе оценки генетического вклада аллелей и гаплотипов гена TNF α в развитие аутоиммунных, инфекционных и мультифакториальных заболеваний [15].

Цель

Необходимо оценить распределение частот встречаемости аллелей, генотипов и гаплотипов SNPs гена TNF α -308 G/А и -238 G/А у больных туберкулезом легких русских Челябинской области.

Материалы и методы

Исследуемую группу составили 86 больных туберкулезом легких русской национальности (29 женщин и 57 мужчин), находящихся на стационарном лечении в ГУЗ «Противотуберкулезный диспансер № 3» г. Челябинска. Согласно российской клинической классификации, выделены следующие группы больных: больные с фиброзно-кавернозным туберкулезом — 11, с инфильтративным — 53, очаговым — 13, цирротическим — 1, туберкулемой — 3, экссудативным плевритом — 2, с диссеминированным туберкулезом — 3 (Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 № 109). Бактериовыделение зафиксировано у 73 % больных. Группу сравнения составили 85 практически здоровых лиц русской популяции (36 женщин и 49 мужчин). Группы имели одинаковый социоэкономический статус.

Типирование SNPs в гене TNF α проводилось методом ПДРФ с эндонуклеазой рестрикции NcoI (-308G-А) и BamHI(-238G-А)[16]. Последовательности праймеров для определения SNPs в генах -308 G/ATNF α и -238 G/ATNF α синтезированы в ООО «Синтол». Реакционная смесь «GenePakTMCore» для постановки ПЦР-реакции синтезировалась в ООО «Лаборатория ИзоГен», г. Москва. ПЦР-амплификация проводилась на приборе «Терцик» (производитель НПФ «ДНК-Технология»). Детекция результатов — электрофорез в 8 %-ном акриламидном геле, гель-документирование.

Для статистической обработки использовались стандартные генетические методы: расчет непараметрического критерия χ^2 , с поправкой Йетса для двух групп сравнения. При абсолютных значениях меньше 5 использовали точный двухсторонний критерий Фишера. Расчет непараметрического критерия χ^2 для 2 степеней свободы. Расчет отношения шансов (OR) с 95 %-ным доверительным интервалом. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$; для промежуточных значений p ($0,05 \leq p \leq 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям.

Расчет частот гаплотипов проводился методом максимального правдоподобия с помощью компьютерной программы Arlequin 3.1 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>).

Результаты

Результаты типирования SNPs в гене TNF α представлены в таблице.

Т а б л и ц а

Распределение аллелей и генотипов SNPs в генах -238TNF α и -308TNF α у больных туберкулезом легких и здоровых лиц русской популяции

	Частота у больных туберкулезом, %	Частота у здорового контроля, %	χ^2	p-Value, χ^2	OR	CI	
Аллели							
TNF-238*G	90,70	96,47	4,73	0,029	0,357	0,137	0,935
TNF-238*A	9,30	3,53	3,81	0,050	2,803	1,070	7,326
TNF-308*G	81,98	87,06	1,69	0,194	0,676	0,374	1,223
TNF-308*A	18,02	12,94	1,69	0,194	1,479	0,818	2,672
Генотипы							
TNF-238*G/G	81,40	92,94	5,08	0,024	0,332	0,124	0,896
TNF-238*G/A	18,60	7,06	4,11	0,043	3,010	1,116	8,089
TNF-308*G/G	65,12	75,29	2,12	0,146	0,613	0,316	1,188
TNF-308*A/A	1,20	1,18	0,00	0,993	0,988	0,061	15,994
TNF-308*G/A	34,94	23,53	2,17	0,141	1,654	0,845	3,231

При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма гена TNF α в положении -308 достоверные различия не были обнаружены. На уровне тенденции у больных туберкулезом легких повышена частота аллеля А и генотипа G/A. Также на уровне тенденции снижена частота аллеля G у больных по сравнению со здоровым контролем, что привело к снижению частоты генотипа G/G. Для TNF α -308 в ряде работ отмечены накопление «высокопродуктивного» аллеля TNF α -308*A в европеоидных популяциях и низкая частота в монголоидных популяциях. Данный полиморфизм лежит в регионе HLAIII и находится в неравновесном сцеплении с каким-то другим функциональным полиморфизмом, который непосредственно оказывает влияние на продукцию TNF α , либо в пределах гена TNF α , либо иного гена в пределах HLA.

Несмотря на то, что по данным нашего исследования данный полиморфизм гена TNF α не влияет на предрасположенность к развитию клинической формы туберкулеза, он находится в неравновесном сцеплении с генами HLADRB1. Ранее нами выявлены достоверные отличия в распределении гаплотипа DRB1*03 — TNF α -308*A: у больных туберкулезом данный гаплотип встречается достоверно чаще по сравнению с контролем [17]. Наличие в генотипе пациента гаплотипа DRB1*03 — TNF α -308*A позволяет прогнозировать высокий риск развития туберкулеза легких. Большинство больных с геном DRB1*03 в фенотипе имели ассоциацию с аллелем TNF α -308*A, который связан с повышенной продукцией фактора некроза опухолей, а значит с более тяжелым течением заболевания [5]. Частота данного гаплотипа повышена у больных с фиброзно-кавернозной формой туберкулеза.

Ранее нами установлено также неравновесное сцепление низкопродуктивного аллеля TNF α -308*G с геном DRB1*16 [8], который является геном предрасположенности к туберкулезу [18]. У больных туберкулезом по сравнению со здоровым контролем достоверно повышена частота встречаемости гаплотипа DRB1*16-TNF α -308*G. Таким образом, у больных туберкулезом аллель DRB1*16 ассоциирован с низкопродуктивным аллелем TNF-308*G. Известно, что низкая продукция TNF α на начальных этапах заболевания ведет к сниженной активации макрофагов и способствует распространению инфекционного процесса вместо ограничения и образования гранулемы.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма гена TNF α в положении -238 выявил достоверное повышение частоты гетерозиготного генотипа G/A (18,60 % и 7,06 %, $\chi^2 = 4,11$, $p = 0,043$) и аллеля А (9,30 % и 3,53 %, $\chi^2 = 3,81$, $p = 0,050$) у больных по сравнению с контролем. По некоторым источникам аллель TNF α -238*A связан с пониженной продукцией цитокина [4]. Кроме того, обнаружено достоверное понижение гомозиготного генотипа G/G (81,40 % и 92,94 %, $\chi^2 = 5,08$, $p = 0,024$) и аллеля G (90,70 % и 96,47 %, $\chi^2 = 4,73$, $p = 0,029$) у больных по сравнению с контролем.

У женщин, больных туберкулезом выше частота встречаемости низкокопродуктивного аллеля TNF α -238*A (10,34 % и 1,39 %, $\chi^2 = 5,06$, p критерий Фишера = 0,044, OR = 8,192 и 95 % CI 1,009÷69,679) и гетерозиготного генотипа G/A (20,7 % и 2,8 %, $\chi^2 = 5,36$, p критерий Фишера = 0,0388, OR = 9,130 и 95 % CI 1,031÷80,357), чем у здоровых. У мужчин различий в распределении TNF α не обнаружено.

На следующем этапе мы рассмотрели гаплотипы TNF α -380G/A / -238G/A.

Сравнительный анализ распределения частот гаплотипов гена TNF α -308/ -238 показал, что у больных туберкулезом по сравнению со здоровым контролем достоверно повышена частота встречаемости гаплотипа -308*G/ -238*A (0,093 и 0,027 соответственно, $\chi^2 = 4,73$, $p = 0,030$, OR = 2,80), отвечающего за низкую продукцию TNF α . Наши данные согласуются с данными литературы в том, что содержание TNF α у больных туберкулезом легких имеет тенденцию к снижению [19].

Низкая продукция TNF альфа у носителей аллеля TNF α -238*A, генотипа TNF α -238*G/A и гаплотипа TNF α -308*G/ -238*A, вероятно, ведет к нарушению иммунного ответа: не происходит кислородного взрыва, снижается активация макрофагов и не происходит образование гранулемы. Все это способствует распространению инфекции и прогрессированию туберкулезного процесса. Таким образом, данные полиморфизмы гена TNF α являются предрасполагающими к развитию клинических форм туберкулеза легких.

У больных туберкулезом легких достоверно снижена частота гомозиготного гаплотипа TNF α -308*G/-238*G (0,727 и 0,843, $\chi^2 = 5,88$, $p = 0,015$, OR = 0,52). Гаплотип TNF α -308*A/-238*A обнаружен не был, что соответствует литературным данным [20].

Таким образом, в нашей работе показаны особенности распределения частот SNPs TNF α у больных туберкулезом легких русской популяции. Установлена ассоциация туберкулеза с генотипами, содержащими низкопродуктивные аллели и гаплотипы TNF α . Можно предположить, что для больных с клиническими формами туберкулеза легких, представителей русской популяции Челябинской области, характерна тенденция к снижению продукции TNF α , что препятствует процессу ограничения очага воспаления и способствует распространению инфекционного процесса и развитию некрозов.

Вариабельность результатов иммуногенетических исследований может быть связана как с генетической гетерогенностью исследованных популяций, так и с патофизиологическими особенностями в патогенезе туберкулеза легких у представителей разных этнических групп. По всей видимости, в процессе расо- и этногенеза частоты аллелей и генотипов приобрели свою специфику у разных народов и это, в свою очередь, могло внести определенный вклад в наследственную компоненту дифференциальной подверженности туберкулезу в разных популяциях. Кроме того, важной проблемой низкой результативности картирования генов предрасположенности к туберкулезу является уникальность индивидуальных сочетаний аллелей генов предрасположенности, формирующих риск заболевания различных популяций, недостаточный объем исследуемых выборок, что не позволяет оценить комплексный характер взаимодействия генов и их конкретную роль в детерминации полигенной предрасположенности к туберкулезу. Несмотря на очевидную практическую значимость, перечисленные выше вопросы недостаточно освещены в литературе. Крайне актуальной является комплексная оценка вовлеченности различных полиморфных вариантов генов-кандидатов в формирование туберкулеза в различных популяциях мира.

Вывод

Для пациентов с клиническими формами туберкулеза легких, европеоидов Челябинской области, характерно следующее распределение частот SNPs гена TNF α : повышена частота встречаемости аллеля TNF α -238*A, генотипа TNF α -238*G/A и гаплотипа TNF α -308*G/-238*A.

Список литературы

- 1 Walzl G., Ronacher K., Hanekom W. Immunological biomarkers of tuberculosis // *Natura Rev. Immunology*. — 2011. — Vol. 11, No. 5. — P. 343–354.
- 2 Engele M., Stossel E., Castiglione K. et al. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis* // *The Journal of Immunology*. — 2002. — Vol. 168. — P. 1328–1337.
- 3 *Сыномницкий М.В.* Эволюционная патология. К вопросу о месте ВИЧ-инфекции и ВИЧ/СПИД-пандемии среди других инфекционных, эпидемических и пандемических процессов. — М., 2009. — 400 с.

- 4 Никулина Е.Л., Наследникова И.О., Сухаленцева Н.А. и др. Функциональный полиморфизм генов IL10 и TNF α при туберкулезе легких // Науки о человеке: Сб. ст. по материалам XII Рос. конгресса молодых ученых с междунар. участием / Под ред. Л.М.Огородовой, Л.В.Капилевича. — Томск, 2011. — С. 104.
- 5 Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология // Цитокины и воспаление. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 4–10.
- 6 Wilson A.G., Symons J.A., Grall F. et al. Effect of a polymorphisms in the human tumor necrosis factor α on transcriptional activation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 3195–3199.
- 7 Бикмаева А.Р., Сибиряк С.В., Хуснутдинова Е.К. и др. Полиморфизм гена фактора некроза опухолей альфа у больных инфильтративным туберкулезом легких в Башкирии // Молекулярная биология. — 2002. — Т. 36, № 5. — С. 784–787.
- 8 Wang Q., Zhan P., Qiu L.X. et al. TNF-308 gene polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis involving 18 studies // Molecular Biology Reports. — 2012. — Vol. 39, No. 4. — P. 3393–4000.
- 9 Correa P., Gomez L., Cadena J. et al. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism // The Journal of Rheumatology. — 2005. — Vol. 32. — P. 219–224.
- 10 Scola L., Crivello A., Marino V. et al. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis: implication for ageing and life span expectancy // Mechanisms of Ageing and Development. — 2003. — Vol. 124, No. 4. — P. 569–572.
- 11 Oral H.B., Budak F., Uzaslan E.K. et al. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphism as a potential host susceptibility factor in tuberculosis // Cytokine. — 2006. — Vol. 35. — P. 143–147.
- 12 Delgado J.C., Baena A., Thim S. et al. Ethnic-specific genetic associations with pulmonary tuberculosis // The Journal of Infectious Diseases. — 2002. — Vol. 186. — P. 1463–1468.
- 13 Zhang Z., Zhu H., Pu X. et al. Association between tumor necrosis factor alpha-238G/a polymorphism and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study // BMC Infectious Diseases. — 2012. — Vol. 12. — P. 328.
- 14 Selvaraj P., Sriram U., Mathan Kurian S. et al. Tumour necrosis factor alpha (-238 and -308) and beta gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis: haplotype analysis with HLA-A, B and DR genes // Tuberculosis (Edinb). — 2001. — Vol. 815, No. 6. — P. 335–341.
- 15 Коненков В.И. и др. Полиморфизм гена TNFA и неравновесное сцепление TNF α и HLA-генов II класса (DRB1, DQA1 и DQB1) в популяции сибирских европеоидов // Иммунология. — 2008. — Т. 29, № 1. — С. 6–10.
- 16 Сташкевич Д.С., Бурмистрова А.Л., Хромова Е.Б. и др. Анализ двухлокусных гаплотипов HLA DRB1-TNF α у больных ревматоидным артритом русской популяции // Российский аллергологический журнал. — 2010. — № 14, Вып. 1. — С. 31–32.
- 17 Тимофеева С.В., Сташкевич Д.С., Суслова Т.А. и др. Распределение двухлокусных гаплотипов HLA-DRB1-TNF α (-308) у больных туберкулезом легких // Вестн. Уральской мед. академич. науки. — 2012. — Т. 4, № 41. — С. 247, 248.
- 18 Тимофеева С.В., Бурмистрова А.Л., Суслова Т.А. и др. Полиморфизм HLAII у больных туберкулезом легких русской популяции челябинской области // Вестн. Уральской мед. академич. науки. — М., 2011. — Т. 2. — С. 117–118.
- 19 Lio D.A., Candore G., Colombo A. et al. Genetically Determined High Setting of TNF-a Influences Immunologic Parameters of HLA-B8, DR3 Positive Subjects: Implications for Autoimmunity // Human Immunology. — 2001. — Vol. 62. — P. 705–713.
- 20 Kettaneh A., Seng L., Tiev K.P. et al. Human leukocyte antigens and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis of case-control studies // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. — 2006. — Vol. 10, No. 7. — P. 717–725.

С.В.Беляева, А.Л.Бурмистрова, Д.С.Сташкевич, Т.А.Суслова, И.П.Ананьева

Челябі облысындағы орыс популяциясының өкілдеріндегі өкпе туберкулезі аурулардың TNF α (-308 и -238) генінің полиморфизмдер тұқымы

Челябі облысындағы орыс популяциясының өкілдеріндегі өкпе туберкулезі ауруларында SNPs гені TNF және туберкулезге бейімділігін анықтау үшін SNPs -308 G/A TNF α и -238 G/A кездесу жиілігі зерттелді. Пайда болған M.Tuberculosis жұқпасының дамуына көбінше себепші болған туберкулезге бейімділік тұқым қуалау факторы екені анықталды. Аллель TNF-238*A, генотип TNF-238*G/A және гаплотип -308G/-238A Челябинск облысындағы орыс популяциясының өкпе туберкулезіне бейімді факторлары екені дәлелденді.

S.V.Belyayeva, A.L.Burmistrova, D.S.Stashkevich, T.A.Suslova, I.P.Anan'yeva

Polymorphisms of the gene of TNF α (-308 and -238) at patients with lung tuberculosis of representatives of the Russian population of Chelyabinsk region

For the first time the analysis of the SNPs -308 G/A TNF α and -238 G/A in Russian patients with tuberculosis of lungs living in Chelyabinsk region has been carried out to determine gene predisposition to tuberculosis of lungs. It was estimated that the progression of the M. tuberculosis infection is mainly due to genetic factors of predisposition. It is shown, that TNF-238*A allele, TNF-238*G/A genotype and -308G/-238A haplotype are the predisposition factors for tuberculosis in Russians.

References

- 1 Walzl G., Ronacher K., Hanekom W. *Natura Rev. Immunology*, 2011, 11(5), p. 343–354.
- 2 Engele M., Stossel E., Castiglione K. et al. *The Journal of Immunology*, 2002, 168, p. 1328–1337.
- 3 Supotnitskiy M.V. *Evolutionary pathology. On-site HIV infection and HIV/AIDS pandemic, among other infectious diseases, epidemic and pandemic processes*, Moscow, 2009, 400 p.
- 4 Nikulina E.L., Naslednikova I.O., Sukhalentseva N.A. et al. *The human sciences: Proc.*, Tomsk, 2011, p. 104.
- 5 Rydlovskaya A.V., Simbirtsev A.S. *Cytokines and Inflammation*, 2005, 4(3), p. 4–10.
- 6 Wilson A.G., Symons J.A., Grall F. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, p. 3195–3199.
- 7 Bikmayeva A.R., Sibiryak S.V., Khusnutdinova E.K. et al. *Molecular biology*, 2002, 36(5), p. 784–787.
- 8 Wang Q., Zhan P., Qiu L.X. et al. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4), p. 3393–4000.
- 9 Correa P., Gomez L., Cadena J. et al. *The Journal of Rheumatology*, 2005, 32, p. 219–224.
- 10 Scola L., Crivello A., Marino V. et al. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2003, 124(4), p. 569–572.
- 11 Oral H.B., Budak F., Uzaslan E.K. et al. *Cytokine*, 2006, 35, p. 143–147.
- 12 Delgado J.C., Baena A., Thim S. et al. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186, p. 1463–1468.
- 13 Zhang Z., Zhu H., Pu X. et al. *BMC Infectious Diseases*, 2012, 12, p. 328.
- 14 Selvaraj P., Sriram U., Mathan Kurian S. et al. *Tuberculosis (Edinb)*, 2001, 815(6), p. 335–341.
- 15 Kononkov V.I. et al. *Immunology*, 2008, 29(1), p. 6–10.
- 16 Stashkevich D.S., Burmistrova A.L., Khromova E.B. et al. *Russian Journal of Allergy*, 2010, 14(1), p. 31–32.
- 17 Timofeyeva S.V., Stashkevich D.S., Suslova T.A. et al. *Herald of Ural Medical Academic Science*, 2012, 4(41), p. 247–248.
- 18 Timofeyeva S.V., Burmistrova A.L., Suslova T.A. et al. *Herald of Ural Medical Academic Science*, 2011, 2, p. 117–118.
- 19 Lio D.A., Candore G., Colombo A. et al. *Human Immunology*, 2001, 62, p. 705–713.
- 20 Kettaneh A., Seng L., Tiev K.P. et al. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2006, 10(7), p. 717–725.

Д.С.Сташкевич¹, А.Л.Бурмистрова¹, Е.Л.Иванова²

¹Челябинский государственный университет;

²Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия
(E-mail: stashkevich_dary@mail.ru)

Анализ ассоциации полиморфных генов основных цитокинов с синдромом раздраженного кишечника

В статье представлены результаты исследования иммуногенетической составляющей синдрома раздраженного кишечника. Установлены особенности частот встречаемости аллелей и генотипов генов цитокинов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF α у больных СРК. Проведен иерархический логлинейный анализ для выявления ассоциации комбинаций генотипов с предрасположенностью к синдрому раздраженного кишечника. Установлены комбинации генотипов генов цитокинов, обладающие протекторными свойствами при СРК: внутригенная комбинация -308G/G- -863 C/A гена TNF α и межгенная комбинация провоспалительных цитокинов IL-1b+3953 C/C- -863C/A TNF α . Выявлены гендерные различия в распределении полиморфизма цитокинов у больных СРК.

Ключевые слова: синдром раздраженного кишечника, гастроэнтерология, иммунная система, дисбиоз кишечника, цитокины, экспрессия, иммунорегуляторы, аллели, генотип, TNF α .

Синдром раздраженного кишечника (СРК) является одной из наиболее актуальных проблем современной гастроэнтерологии. Особенности проблемы СРК являются: высокая распространенность полисистемных жалоб, отсутствие четких диагностических маркеров, ограничение спектра эффективных методов лечения, направленных на биологические дефекты. В большинстве работ СРК рассматривается как хронический абдоминальный симптомокомплекс [1].

Распространенность СРК в большинстве стран мира составляет в среднем 20 %, варьируя от 9 до 48 % [2]. В развитых странах Европы, Америки, в Японии, Китае обращаемость высока и распространенность заболевания достигает 30 %; в Таиланде — 5 %, в Иране — 3,4 %. Пик заболеваемости приходится на трудоспособный возраст — 30–40 лет. Соотношение женщин и мужчин среди больных, по разным данным, варьирует от 1:1 до 2:1. Средний возраст пациентов составляет 24–41 год [2].

Развитию СРК могут предшествовать личностные особенности, обусловленные генетически или сформировавшиеся под влиянием окружающей среды [3]. В качестве генетической составляющей СРК изучаются генетический полиморфизм, вовлеченный в обмен серотонина, адренэргической и опиоидной систем, а также гены, кодирующие белки с иммуномодулирующими и/или нейромодулирующими свойствами. Среди генов-кандидатов СРК в зарубежных источниках рассматриваются: SLC6A4 — ген серотонин-транспортера, ген α -2адренэргического рецептора, COMT-ген катехол-о-метилтрансферазы, GNB3 — ген β 3 субъединицы G-белка и т.д. [3].

Сегодняшние представления о патофизиологии СРК позволяют предположить, что в основе запуска или усиления патологического процесса лежит комбинация факторов — недостаточная или избыточная активация иммунной системы и дисбиоз кишечника. Участие цитокинов в патофизиологических процессах при СРК подтверждают данные лабораторных исследований: снижена экспрессия иммунорегуляторных цитокинов и повышена экспрессия провоспалительных цитокинов [4–6].

В связи с тем, что продукция цитокинов находится под генетическим контролем, то можно предположить, что генетические полиморфизмы определенных цитокинов могут выступать в качестве факторов, определяющих чувствительность персоны к развитию патологии и влияющих на вариабельность клинических проявлений СРК.

Цель: установить распределение частот аллелей, генотипов и сочетаний генотипов генов основных цитокинов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF α у больных синдромом раздраженного кишечника европеоидного происхождения, проживающих на территории Челябинской области.

Задачи:

1. Оценить частоты встречаемости аллелей и генотипов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF α у больных СРК в сравнении с условно-здоровыми представителями русской популяции.
2. Выявить особенности распределения полиморфизма генов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF α в зависимости от пола у больных СРК.

3. Оценить ассоциацию межгенных и внутригенных взаимодействий L-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF α в виде сочетаний генотипов генов цитокинов с восприимчивостью к СРК.

Материал и методы

В исследование включен 81 человек русской этнической группы с диагнозом СРК. Пациенты находились на лечении в гастроэнтерологическом отделении Дорожной клинической больницы МПС на станции «Челябинск» в период с 2001 по 2007 гг. Для диагностики заболевания использовались Римские критерии III (2007). Средний возраст начала заболевания составил $32,8 \pm 1,4$ лет, длительность заболевания в среднем от 3 до 10 лет у половины пациентов. Обследования пациентов проводились по утвержденным Медико-экономическим стандартам Министерства здравоохранения 1998 г.

Контрольную группу составляли потенциальные доноры костного мозга ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови»: 213 человек, из них мужчин — 119 (55,9 %), женщин — 94 (44,1 %). Средний возраст составил $34,6 \pm 0,75$ лет. Этническая принадлежность больных СРК и здоровых лиц определялась согласно рекомендациям Международного Уоркшопа (1980 г., Лос-Анджелес, США). Демографическая характеристика обследуемых групп представлена в таблице.

Т а б л и ц а

Демографическая характеристика обследуемых групп

Пол, возраст	Группа сравнения		Больные, СРК	
	213	%	81	%
Мужчины	119	55,9	23	28,4
Женщины	94	44,1	58	71,6
Средний возраст, лет	$34,6 \pm 0,75$		$41,9 \pm 1,3$	

Характеристика исследуемых полиморфизмов. Гены IL-1b и IL-1Ra расположены на второй хромосоме в районе 2q12 [7, 8]. Для исследования полиморфизма по одному нуклеотиду (SNP) в 5 экзоне гена IL-1b (положение +3953) использовали разновидность ПЦР – ПДРФ – анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. В основе метода лежит ПЦР, с последующей обработкой ампликонов ферментом эндонуклеазой рестрикции Taq I при температуре +65 °C в течение 8 часов.

При гидролизе амплификационного фрагмента гена IL-1b выявлялось три фрагмента размером 550 п.н., 146 п.н. и 404 п.н. Фрагмент 550 п.н. соответствует амплификационному фрагменту, не подвергнувшемуся гидролизу, что указывает на наличие аллеля IL-1b (+3953) T, гомозиготное состояние обозначено m/m (сокращение от mutant — мутантный аллель). При наличии аллеля C происходит разрезание ампликона на два фрагмента — 146 п.н. и 404 п.н., гомозиготность по этому аллелю обозначена w/w (сокращение от wild — аллель дикого типа), а гетерозиготное состояние C/T в данном исследовании обозначено как w/m [8, 9]. Для определения полиморфизма типа варьирующего числа tandemных повторов (VNTR) в гене IL-1Ra использовали ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах второго интрона, в котором находится VNTR участка длиной 86 п.н. В результате ампликации мы идентифицировали фрагменты ДНК размером 438, 524, 610, и 696 н.п., соответственно с 2, 3, 4 и 5 копиями tandemных повторов [8–10]. Эти аллели были обозначены как 2R, 3R, 4R и 5R в данном исследовании.

Ген IL-4 расположен на длинном плече 5 хромосомы [8, 9]. Для исследования VNTR IL-4 проводили ПЦР с праймерами, фланкирующими полиморфный регион в пределах 3-го интрона, в котором находится переменное количество tandemных повторов размером 70 н.п. В результате ампликации идентифицировали фрагменты ДНК размерами 255 и 325 н.п. соответственно, с 2 и 3 копиями tandemных повторов. Эти аллели были обозначены как 2R и 3R [9]. Наборы для типирования генов цитокинов синтезированы группой фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН). Детекция полученных ампликонов проводилась методом вертикального электрофореза в 8 %-ном полиакриламидном геле.

Ген TNF α располагается в пределах главного комплекса гистосовместимости MHC и относится к генам HLA III класса. Он отстоит на 600 кДа от локуса HLA-B и характеризуется высоким количеством SNPs в промоторной области, наиболее известными являются положения -308, -238. Однако есть и другие полиморфизмы типа SNP, например, -863, способные также влиять на экспрессию TNF α [7, 11]. Типирование SNPs в гене TNF α – ПДРФ – анализ полиморфизма длины рестрикционных

фрагментов: амплификация с последующей обработкой ампликонов эндонуклеазами рестрикции NcoI (37 °C в течение 16 часов) для положения -308 (G/A), TaqI для положения -863 (65 °C в течение 8 часов). Детекция результатов — электрофорез в 8 % ПААГе.

Статистическая обработка. В работе использовались стандартные иммуногенетические критерии: критерий χ^2 — для 1 степени свободы и выше, критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность применялся для одной степени свободы, когда абсолютные частоты были меньше 10, критерий Фишера использовался при абсолютных частотах меньше 5. Для анализа ассоциации комбинаций генотипов с восприимчивостью к СРК применялся иерархический логлинейный анализ, в котором считывался критерий максимального правдоподобия (G) и отклонения Фримана-Тьюки. Для оценки вероятности возникновения признака (заболевания или какой-то клинической характеристики) в зависимости от генетического варианта (аллеля, генотипа, комбинации генотипов) применялся критерий отношения шансов (OR) с расчетом 95 %-ного доверительного интервала (CI) — отношение шансов в одной группе к шансам этого же события в другой группе. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$, незначимыми при $p > 0,10$; для промежуточных значений p ($0,05 \leq p \leq 0,10$) обсуждали тенденцию к различиям [12].

Результаты и их обсуждение

1. На первом этапе был проведен анализ распределения частот встречаемости аллелей и генотипов генов исследуемых цитокинов в группах больных СРК и условно-здоровых лиц русской популяции Челябинской области. Частоты встречаемости аллелей и генотипов генов IL-1Ra, IL-1b, IL-4, -308G/A TNF α не отличались между исследуемыми выборками. Различия были установлены только для частот аллелей и генотипов в точке -863 TNF α (на уровне тенденции).

Группа больных СРК характеризовалась сниженной частотой аллеля с заменой -863*A, связанного с повышением продукции TNF α [11] и повышенной частотой другого — частого аллеля -863*C (на уровне тенденции $\chi^2 = 3,23$, $p = 0,0722$ для одной степени свободы), но по критерию отношения шансов (OR) такое перераспределение частот аллелей не имеет диагностической значимости (OR = 0,57 95 %CI 0,3–1,06).

Больные СРК также отличались от условно-здоровых лиц повышенной частотой генотипа -863 CC TNF α (82,5 % против 72,8 %, $\chi^2 = 2,97$, $p = 0,0848$ для одной степени свободы, на уровне тенденции), но как маркер предрасположенности к СРК данный генотип выступать, вероятно, не может, так как расчет критерия OR показал, что его доверительный интервал находится в диапазоне, захватывающем единицу: OR = 1,76 95 %CI 0,92–3,39.

Таким образом, установленные изменения частот аллелей и генотипа CC полиморфного сайта -863 промоторной области гена TNF α могут быть особенностью группы больных СРК, но не являются маркерами группы риска СРК.

2. Вторая задача посвящена рассмотрению наличия или отсутствия изменений в частотах встречаемости аллелей и генотипов генов цитокинов у больных СРК в зависимости от пола. У женщин, больных СРК, выявлены следующие особенности.

IL-1Ra. Повышена частота аллеля 2R IL-1Ra (на уровне тенденции, $\chi^2 = 2,82$, $p = 0,093$ OR = 1,54, 95 % CI 0,93÷2,5) за счет увеличения количества носителей гомозиготного генотипа 2r/2r ($p = 0,09$ OR = 2,64, 95 % CI 0,88÷7,9). Однако общий эффект взаимодействия между частотами аллелей и генотипов IL-1Ra и предрасположенностью к СРК у женщин оказался незначительным.

IL-1b. В ходе анализа был показан вклад +3953 SNP IL-1 β в предрасположенность к СРК у женщин ($G = 6,64$, $df = 2$, $p = 0,036$). Обнаружено, что статистически значимый эффект достигался за счет изменения частоты генотипа T/T (0 % против 9,57 % в контроле, $p = 0,013$).

TNF α -308 G/A. Еще одной особенностью являлось изменение частот генотипов SNP -308 G/A TNF α у практически здоровых и больных СРК женщин (на уровне тенденции). Группа больных СРК характеризовалась повышенной частотой гетерозиготного генотипа -308G/A (33,9 % против 20,21 %, $\chi^2 = 3,57$ $p = 0,06$, OR = 2,02 95 %CI 0,96÷4,26) и пониженной частотой гомозиготного генотипа G/G -308 TNF α (64,41 % против 77,66 %, $\chi^2 = 3,20$ $p = 0,07$, OR = 0,52 95 %CI 0,25÷1,08). Однако по критерию отношения шансов такое изменение частот не имело прогностического значения для расчета вероятности развития предрасположенности к СРК у женщин.

Частоты аллелей и генотипов IL-4, -863 C/A TNF α не различались между исследуемыми группами.

Несмотря на то, что группа мужчин, страдающих СРК, была значительно меньше группы женщин, анализ распределения частот встречаемости аллелей и генотипов генов цитокинов у практиче-

ски здоровых и больных СРК мужчин позволил выявить различия в частотах встречаемости аллелей и генотипов IL-1Ra и гомозиготного генотипа по редкому аллелю -308 A/A TNF α . У мужчин, страдающих СРК, чаще встречался генотип -308 A/A TNF α (9,09 % против 0,84 %, $p = 0,064$, OR = 11,8 95 % CI 0,99÷139,2), несмотря на то, что благодаря такому распределению частот общий эффект оказался значим на уровне тенденции.

Более информативными были различия в распределении частот встречаемости аллелей и генотипов IL-1Ra. У мужчин, страдающих СРК, снижены частоты аллеля 2R и его гетерозиготного генотипа 4R/2R по сравнению с контролем. Согласно критерию отношения шансов носительство аллеля с 2-кратным повтором уменьшает вероятность возникновения СРК по сравнению с носительством других аллелей IL-1Ra (OR=0,38 95 % CI 0,15÷0,94), но только в гетерозиготном состоянии вместе с аллелем 4R (OR=0,31 95 % CI 0,097÷0,97). В свою очередь присутствие аллеля 4R в гомозиготном состоянии повышает вероятность развития СРК у мужчин: для носительства аллеля 4R коэффициент OR составил 2,4 95 % CI 1,012÷5,62, для генотипа 4R/4R — OR = 3 95 % CI 1,09÷8,27.

Таким образом, выделение групп больных по полу позволило установить маркеры предрасположенности к СРК среди исследуемых генов цитокинов отдельно для женщин и мужчин, тогда как при объединении в общую выборку установленные различия нивелировались.

3. Оценка ассоциации межгенных и внутригенных взаимодействий с предрасположенностью / устойчивостью к СРК проводилась с помощью иерархического логлинейного анализа.

Установлена значимость следующих комбинаций генотипов: протекторными свойствами обладали комбинации генотипов SNPs TNF α -308G/G- -863 C/A (11,25 % vs 23,0 % $\chi^2 = 4,35$, $p = 0,0371$, OR = 0,57 95 % CI 0,19–0,91), IL-1b+3953 C/C- - 863C/A TNF α (6,25 % vs 16,43 % $\chi^2 = 4,29$, $p = 0,0384$ OR = 0,34 95 % CI 0,13–0,9). По нашему мнению, ведущее значение в данных комбинациях отводится гетерозиготному генотипу — 863C/A TNF α .

Выводы

1. Особенность больных СРК европеоидного происхождения — повышенная частота гомозиготного генотипа -863C/C гена TNF α .

2. Установлены маркеры, снижающие вероятность развития СРК: у женщин — гомозиготный генотип T/T +3953 IL-1b, у мужчин — аллель 2r и генотип 4r/2r гена IL-1Ra.

3. Выявлены комбинации генотипов генов цитокинов, обладающие протекторными свойствами при СРК: внутригенная комбинация -308G/G- -863 C/A гена TNF α и межгенная комбинация генов провоспалительных цитокинов IL-1b+3953 C/C — - 863C/A TNF α .

Заключение

В патогенез каждого заболевания вовлекается много разных функционально взаимосвязанных генов той или иной локальной генной сети. Наряду с главными генами, провоцирующими начало болезни, всегда присутствуют другие, второстепенные, в том числе многочисленные гены-модификаторы, фенотипические эффекты которых во многом определяются средовыми факторами. К таким генам относятся гены воспаления, в частности гены цитокинов. Их идентификация, выявление характера функциональных поломок на уровне локальных генных сетей, особенностей ген-генных взаимодействий при мультифакторной патологии являются важными задачами постгеномной информатики и персонализированной медицины. Наше исследование вносит вклад в развитие представлений об иммуногенетической компоненте синдрома раздраженного кишечника.

Список литературы

- 1 Бурмистрова А.Л. Иммунный гомеостаз и микросимбиоз. Метаморфозы и пути развития воспалительных заболеваний. — Челябинск: Челябинский Дом печати, 1997. — 216 с.
- 2 Ивашкин В.Т., Шептулин А.А. Избранные лекции по гастроэнтерологии. — М.: Медпресс-информ, 2002. — 85 с.
- 3 Hotoleanu C., Popp R., Trifa A.P., Nedelcu L., Dumitrascu D.L. Genetic determination of irritable bowel syndrome // World Journal of Gastroenterology. — 2008. — Vol. 14, No. 43. — P. 6636–6640.
- 4 Родионова О.Н., Бабаева А.Р. Патогенетическая роль сывороточных цитокинов при синдроме раздраженного кишечника // Цитокины и воспаление. — 2011. — Т. 10., № 3. — С. 45–48.
- 5 Oscar R.-F., Hernandez-Ruiz J., Schmulson M. From cytokines to toll-like receptors and beyond — current knowledge and future research needs in irritable bowel syndrome // Journal of Neurogastroenterology and Motility. — 2010. — Vol. 16. — P. 363–373.

- 6 Saito Y.A., Talley N.J. Genetics of Irritable bowel syndrome // *American Journal of Gastroenterology*. — 2008. — Vol. 103. — P. 2100–2104.
- 7 Рыдловская А.В., Симбирцев А.С. Функциональный полиморфизм гена TNF α и патология // *Цитокины и воспаление*. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 4–10.
- 8 Шабалдин А.В., Филипенко М.Л., Воронина Е.Н., Глушков А.Н., Симонова Т.А. Полиморфизм генов антагониста рецептора интерлейкина-1 и интерлейкина-4 при репродуктивных нарушениях // *Иммунология*. — 2005. — № 1. — С. 6–9.
- 9 Бурмистрова А.Л., Сташкевич Д.С., Сулова Т.А., Девальд И.В., Исаканова А.О., Димчева О.Н. Молекулярно-генетический анализ полиморфизмов генов цитокинов — интерлейкина-1 β , рецептора антагониста интерлейкина-1 и интерлейкина-4 у больных ревматоидным артритом башкирской этнической группы, проживающих в Челябинской области // *Медицинская иммунология*. — СПб.: Человек, 2007. — Т. 9, № 6. — С. 631–634.
- 10 Carreira P.E., Gonzalez-Crespo M.R., Ciruelo E. et al. Polymorphism of the Interleukin-1 Receptor antagonist gene a factor in susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population // *Arthritis & Rheumatism*. — 2005. — Vol. 52. — P. 3015–3019.
- 11 Heesen M., Kunz D., Wessiepe M. et al. Rapid genotyping for tumor necrosis factor- α (TNF α) -863C/A promoter polymorphism that determines TNF- α response // *Clinical Chemistry*. — 2004. — Vol. 50. — P. 226–228.
- 12 Sokal R.R., Rolf F.J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. — N.Y.: Freeman & Co, 1995. — 850 p.

Д.С.Сташкевич, А.Л.Бурмистрова, Е.Л.Иванова

Ісінген ішек синдромы мен негізгі цитокиндерде полиморфтық гендер ассоциацияларын талдау

Мақалада ісінген ішек синдромының иммуногенетикалық құрамдас бөлігін зерттеу нәтижесі көрсетілген. IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF α цитокин гендерде аллельдер мен генотиптердің ісінген ішек синдромы бар ауруларда кездесу жиілігі анықталды. Ісінген ішек синдромына бейімділік пен генотиптердің комбинациясының байланысын анықтау үшін иерархиялық логсатылы (логлинейный) талдау жасалды. Ісінген ішек синдромы кезінде қорғаушылық қасиеті бар цитокин гендердің генотиптер комбинациясы анықталды: TNF α генінің -308G/G- -863 C/A генішіндегі комбинациясы және IL-1b+3953 C/C — -863C/A TNF α генаралық комбинациясы. Ісінген ішек синдромы бар ауруларда цитокиндердің полиморфизмін үлестіруде гендерлік айырмашылықтар байқалды.

D.S.Stashkevich, A.L.Burmistrova, E.L.Ivanova

Analysis of polymorphic genes of the major association of cytokines with irritable bowel syndrome

The results of the research of immunogenetic component of irritable bowel syndrome are shown. The peculiarities of frequencies of alleles and genotypes of cytokine genes IL-1Ra, IL-1b, IL-4, TNF α in patients with IBS are established. Log-Linear hierarchical analysis is conducted to identify combinations of genotypes and their association with susceptibility to irritable bowel syndrome. Mounted combination of genotypes of cytokine genes that have protective properties in IBS: intragenic combination -308G/G- -863 C/A and TNF α gene intergenic combination of pro-inflammatory cytokines IL-1b +3953 C/C- -863C / A TNF α . Gender differences in the distribution of polymorphisms of cytokines in patients with IBS are identified.

References

- 1 Burmistrova A.L. *Mikrosimbioceoz and Immune Homeostasis. Metamorphoses and ways of development of inflammatory diseases*, Chelyabinsk: Chelyabinsk Publishing House, 1997, 216 p.
- 2 Ivashkin V.T., Sheptulin A.A. *Featured lectures on Gastroenterology*, Moscow: Medpress-inform, 2002, 85 p.
- 3 Hotoleanu C., Popp R., Trifa A.P., Nedelcu L., Dumitrascu D.L. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, 14(43), p. 6636–6640.
- 4 Rodionova O.N., Babayev A.R. *Cytokines and inflammation*, 2011, 10(3), p. 45–48.
- 5 Oscar R.-F., Hernandez-Ruiz J., Schmulson M. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 2010, 16, p. 363–373.
- 6 Saito Y.A., Talley N.J. *American Journal of Gastroenterology*, 2008, 103, p. 2100–2104.
- 7 Rydlovskaya A.V., Simbirtsev A.S. *Cytokines and inflammation*, 2005, 4(3), p. 4–10.
- 8 Shabaldin A.V., Filipenko M.L., Voronina E.N., Glushkov A.N., Simonova T.A. *Immunology*, 2005, 1, p. 6–9.
- 9 Burmistrova A.L., Stashkevich D.S., Suslova T.A., Deval'd I.V., Isakanova A.O., Dimcheva O.N. *Medical Immunology*, St. Petersburg: Chelovek, 2007, 9(6), p. 631–634.

- 10 Carreira P.E., Gonzalez-Crespo M.R., Ciruelo E. et al. *Arthritis & Rheumatism*, 2005, 52, p. 3015–3019.
- 11 Heesen M., Kunz D., Wessiepe M. et al. *Clinical Chemistry*, 2004, 50, p. 226–228.
- 12 Sokal R.R., Rolf F.J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, N.Y.: Freeman & Co, 1995, 850 p.

Е.Б.Хромова¹, А.Л.Бурмистрова¹, Т.А.Суслова¹,
Т.В.Шилова², А.Ю.Пищальников², Д.К.Волосников²

¹Челябинский государственный университет;

²Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия
(E-mail: dk_vol@mail.ru)

Ассоциация генов HLA II класса с развитием ревматоидного артрита у взрослых и ювенильного идиопатического артрита у детей русской популяции Челябинской области

В статье изучены особенности частоты встречаемости генов HLA II класса локусов DR, DQA1, DQB у больных ревматоидным артритом и ювенильным идиопатическим артритом в популяции русских Челябинской области. В указанных локусах авторами определены гены предрасположенности и устойчивости к развитию аутоиммунных ревматических заболеваний.

Ключевые слова: заболеваемость, популяции, ревматоидный артрит, ювенильный идиопатический артрит, полиморфизм системы HLA, эпитоп, антигены, иммунная реакция, аутореактивные клоны, Т-лимфоциты, органы-мишени, суставная ткань.

Заболеваемость аутоиммунными ревматическими заболеваниями и их распространенность существенно варьирует среди этнически и географически различных популяций во всем мире. Наиболее распространенным среди взрослого населения является ревматоидный артрит, а наиболее частым и самым инвалидизирующим ревматическим заболеванием у детей является ювенильный идиопатический артрит [1].

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное ревматическое заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом и системным поражением внутренних органов [1]. Ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) рассматривается как артрит неустановленной этиологии, присутствующий в течение 6 недель, возникший до 16-летнего возраста, при исключении других заболеваний [2]. От ревматоидного артрита взрослых ювенильный ревматоидный артрит отличается как по суставным, так и по внесуставным проявлениям [3].

РА и ЮИА соответствуют модели мультифакториального, полигенно-наследуемого заболевания, для которого являются характерными семейная подверженность, наличие наследственных маркеров предрасположенности к заболеванию, вариабельность клинических проявлений, зависящая от пола и возраста. К наследственным факторам, вовлеченным в процесс развития РА и ЮИА, традиционно относят генетическую предрасположенность, гормональный фон, расовую/этническую принадлежность, а к средовым — разнообразные внешние воздействия (вирусная и бактериальная инфекции, травма сустава, переохлаждение организма, инсоляция, лекарственные препараты и др.).

Роль наследственных факторов в развитии заболевания подтверждают различные иммуногенетические исследования [4, 5], при этом примерно 17 % для ЮИА и 40 % для РА от всей генетической составляющей принадлежит главному комплексу гистосовместимости человека — системе HLA [6, 7]. Детальный анализ ассоциаций РА и ЮИА с системой HLA демонстрирует, что HLA аллели ассоциируются не только с чувствительностью, но и с протекцией (устойчивостью) к развитию заболевания [8, 9].

Кроме этого, поиск генов предрасположенности, как и устойчивости к РА и ЮИА, проводимый во всем мире, привел к пониманию наличия межпопуляционных и межэтнических особенностей аллельного полиморфизма системы HLA, отражающих своеобразие условий проживания и образа жизни популяций в различных регионах мира [10]. Так, по данным многих авторов, заболеваемость и распространенность РА и ЮИА существенно варьирует среди этнически и географически различных популяций во всем мире. Известны регионы как с высокой (Англия, Швеция, Финляндия, Норвегия, Австралия, США), так и с низкой (Африка, Азиатские страны — Индия, Корея, Китай, Япония) частотой заболеваемости как для ЮИА, так и для РА. При этом даже в пределах одной страны заболеваемость РА и ЮИА отличается между различными этническими группами [5, 11].

Целью нашего исследования является анализ распределения генов HLA II класса локусов DRB1, DQA1, DQB1 у детей, страдающих ЮИА, и взрослых с диагнозом РА русской этнической группы Челябинской области.

Материал и методы

Группа больных ЮРА. Нами был обследован материал от 67 детей (67 % девочек и 33 % мальчиков) в возрасте 1–17 лет с установленным диагнозом ЮИА русской этнической группы. В соответствии с вариантом течения заболевания системный вариант отмечался у 22 пациентов (33 %); олигоартикулярный у 25 детей (37 %); полиартикулярный вариант верифицирован у 20 больных (30 %). Длительность заболевания к моменту исследования составила в среднем $4,8 \pm 4,3$ года, манифестация первых клинических проявлений наблюдалась в среднем в $5,7 \pm 4,5$ года.

Группа больных РА. Среди общего количества обследованных больных РА было 83 женщины (83 %) и 17 мужчин (17 %). Возраст больных был от 19 до 75 лет, средний возраст составил $51,5 \pm 12,0$ лет. Возраст начала заболевания от 12 до 68 лет, средний возраст начала заболевания составил $40,7 \pm 13,1$ года. Все пациенты были классифицированы по группам согласно рабочей классификации ревматоидного артрита.

В качестве контрольной группы использовали популяционную выборку, сформированную на основе ДНК-банка потенциальных доноров стволовой клетки ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови». Контрольную группу составили 207 человек русской национальности, являющихся донорами Челябинской областной станции переливания крови и постоянно проживающих в Челябинской области. Одним из критериев отбора образцов было отсутствие родства между индивидуумами.

Типирование генов HLA I и II класса локусов DRB1, DQA1, DQB1 проводилось методом ПЦР с помощью наборов реагентов фирмы «ДНК-Технология» и набором сиквенс-специфических праймеров [12].

Статистическая обработка включала расчет частоты встречаемости гена (Pх) и антигена (Ах%), рассчитываемая по закону Харди-Вайнберга, χ^2 критерий Пирсона с использованием поправки Йетса на непрерывность и критерий отношения шансов (OR).

Результаты и их обсуждение

Основой патогенеза ревматоидного артрита и идиопатического артрита является нарушение презентации антигенов. Доминантную роль в селекции и презентации антигенов в кооперации иммунных клеток играют гены HLA и кодированные ими антигены. Согласно литературным данным, в европеоидных популяциях установлена ассоциация ревматоидного артрита взрослых с генами локуса DRB1*01, *03, *04, а для ЮИА с генами В*27, DRB1*08, *11 [13–15].

В нашем исследовании при сравнении группы больных ЮИА нами определено статистически достоверное повышение частоты встречаемости гена DRB1*08 ($p < 0,05$, OR = 3,2, 95 % CI = 1,4–6,8). Сравнительный анализ распределения вариантов генов в локусе DQA1 показал, что в данной группе пациентов выявлено повышение частоты аллеля DQA1*04:01 ($p < 0,05$, OR = 3,3, 95 % CI = 1,4–7,5) относительно контроля. Результаты представлены в таблице.

В локусе DQB1 у детей с ЮИА повышена частота встречаемости аллеля DQB1*04:02 ($p < 0,05$, OR = 3,2, 95 % CI = 1,3–7,6). Результаты расчетов критерия отношения шансов (OR) и значение 95 % доверительного интервала свидетельствуют об ассоциативной роли этих генов в развитии ЮИА в популяции русских, проживающих на территории Челябинской области. При этом следует отметить, что наши данные согласуются с исследованиями, проведенными в различных европейских популяциях, например: Греции, Германии, Норвегии, Дании, Польше [10].

В группе больных РА установлено достоверное повышение частоты встречаемости гена HLA DRB1*04, чем в контрольной группе (57,00 % у больных РА против 18,81 % в контроле, $p < 0,001$, OR = 5,72), что определяет предрасполагающую роль этого гена в развитии РА. Эти данные совпадают с выводами работ о положительной ассоциации DRB1*04 с РА в большинстве европейских популяций [7, 16].

У больных РА, проживающих в Челябинской области, достоверно реже встречаются следующие варианты гена HLA DRB1: *11 (10 % против 18 %, $\chi^2 = 3,89$, $p < 0,05$, OR = 0,48 при 95 % CI = 0,23–1,01), *13 (12,0 % против 27,7 %, $\chi^2 = 9,48$, $p < 0,05$, OR = 0,36 при 95 % CI = 0,18–0,70), *15 (13,0 % против 26,7 %, $\chi^2 = 7,31$, $p < 0,05$, OR = 0,41 при 95 % CI = 0,21–0,80). Так как OR этих генов меньше 0,5 и эти значения с учетом 95 %-ного доверительного интервала меньше единицы, то полученные результаты позволяют рассматривать данные варианты HLA DRB1 как протекторные для развития РА у русских Челябинской области.

Распределение генов HLA II класса (локусы DRB1, DQA1 и DQB1) у больных ЮИА и РА

Ген	Пациенты с ЮИА n = 67			Пациенты с РА n = 100		
	n	Ax (%)	Px	n	Ax (%)	Px
DRB1*01	21	31,34	0,171	36	36,0	0,200
DRB1*03	16	23,88	0,128	26	26,0	0,139
DRB1*04	10	14,93	0,078	57	57,0	0,344
DRB1*07	11	16,42	0,086	18	18,0	0,094
DRB1*08	14	20,90	0,111	3	3,0	0,015
DRB1*11	18	26,87	0,145	10	10,0	0,051
DRB1*13	19	28,36	0,154	12	12,0	0,062
DRB1*15	15	22,39	0,119	13	13,0	0,067
DQA1*01:01	21	31,34	0,171	35	36,00	0,200
DQA1*01:02	14	20,90	0,111	17	16,00	0,083
DQA1*01:03	16	23,88	0,128	9	9,00	0,046
DQA1*02:01	11	16,42	0,086	18	18,00	0,094
DQA1*03:01	13	19,40	0,102	60	61,00	0,376
DQA1*04:01	12	17,91	0,094	3	3,00	0,015
DQA1*05:01	35	52,24	0,309	41	41,00	0,232
DQB1*02:01	24	35,82	0,199	32	32,00	0,175
DQB1*03:01	28	41,79	0,237	42	42,00	0,239
DQB1*03:02	6	8,96	0,046	34	34,00	0,188
DQB1*03:03	4	5,97	0,030	14	14,00	0,073
DQB1*04:02	11	16,42	0,086	3	3,00	0,015
DQB1*05:01	21	31,34	0,171	38	39,00	0,219
DQB1*06:02	22	32,84	0,180	16	16,00	0,083

Примечание. Жирным шрифтом выделены различия при $p < 0,05$.

Сравнительный анализ распределения вариантов гена HLA DQA1 показал, что в группе больных РА достоверно повышена частота аллеля DQA1*03:01 относительно контроля (61,0 % против 23,3 %, $\chi^2 = 41,45$, $p < 0,001$, OR = 5,16 95 %CI = 3,07–8,67). Аллели DQA1*01:02, *01:03 встречаются достоверно реже ($\chi^2 = 7,54$, $p < 0,05$ и $\chi^2 = 5,36$, $p < 0,05$), что позволяет предположить протективную роль этих аллелей в развитии предрасположенности к РА.

В локусе DQB1 у больных РА достоверно повышена частота аллеля *03:02 (34,0 % против 14,36 %, $\chi^2 = 15,63$, $p < 0,001$, OR = 3,07, 95 %CI = 1,73–5,45). В меньшей степени оказалась повышенной частота другого аллеля DQB1*03:01. Однако это повышение не достигало уровня статистической значимости ($p > 0,05$). Достоверно и очень существенно снижена частота встречаемости аллеля DQB1*06:02/8 в группе больных ревматоидным артритом (16,0 % против 40,1 %, $\chi^2 = 17,82$, $p < 0,001$, OR = 0,28, 95 %CI = 0,16–0,52).

Полученные ассоциации определенных вариантов генов HLA различных локусов II класса с развитием ревматоидного артрита взрослых и ювенильного идиопатического артрита могут объясняться либо прямым включением HLA-антигенов в патогенез этих болезней (теория «молекулярной мимикрии», рецепторная теория, гипотеза общего эпитопа), либо существованием неравновесного сцепления между аллелями HLA и генами-регуляторами иммунного ответа (Iг-генами).

Точные механизмы ассоциации HLA-DRB1*08, DQA1*04:01, DQB1*04:02 с ЮИА еще не выяснены. По некоторым данным, HLA-DRB1*08 находится в неравновесном сцеплении с геном TAP1B, который кодирует мембранные белки-переносчики, отвечающие за движение эндогенных антигенных пептидов по эндоплазматической сети и погрузку их на молекулы HLA I и II класса. Таким образом, абберации в TAP-генах могут нарушать процесс доставки антигенных, в том числе и эндогенных, пептидов к молекулам HLA. Однако следует отметить, что именно молекулы HLA-DRB1 играют ведущую роль в изменении процесса презентации антигенов иммунокомпетентным клеткам. В результате происходит стимуляция выработки провоспалительных цитокинов Т-лимфоцитами,

в том числе ФНО- α , которые, в свою очередь, стимулируют пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов и продукцию аутоантител [4, 6].

Механизм ассоциации генов HLA-DRB1*04, DQA1*03:01, DQB1*03:02 с РА был предложен еще в 1987 г. П.Греггерсенем. Согласно его теории, варианты генов HLA-DRB1*04, которые ассоциированы с РА, кодируют синтез очень близких друг другу последовательностей аминокислот в положении 8–12 первой гипервариабельной области DR β 1 цепи, образующей антигенсвязывающую бороздку. Эти последовательности получили название «общий эпитоп» (shared epitope — SE). Точные механизмы реализации «общего эпитопа» в развитии заболевания до конца не выяснены. Возможно, этот эпитоп с высокой степенью аффинности специфически связывает антигены синовиальных оболочек, что активирует иммунную реакцию аутореактивных клонов Т-лимфоцитов на собственные антигены суставной ткани, и таким образом предрасполагает к аутоиммунному артриту [17]. Но до сих пор не было идентифицировано такого пептида, который узнавался бы единственным Т-хелпером и выходил на однотипное развитие иммунного ответа в определенных органах-мишенях. Однако некоторые измененные варианты естественных пептидов приближаются к требуемой модели, делая это объяснение вполне вероятным. Однако такая же последовательность также присутствует на DR β 1 цепи HLA-DRB1*03, но его роль в патогенезе РА в нашем исследовании не определена, что может объясняться этническими особенностями изучаемой популяции.

Помимо ассоциации с развитием аутоиммунных ревматических заболеваний в нашем исследовании определены протективные к развитию заболевания гены HLA: DRB1*11, DRB1*13, DRB1*15, DQA1*01:02, DQA1*01:03, DQB1*06:02. Подобные ассоциации были обнаружены в исследованиях других мировых популяций — англичан, норвежцев, датчан [11]. Основываясь на этих наблюдениях, E.Zanelli сформулировал альтернативную гипотезу для механизма ассоциации между генами HLA II класса и РА — гипотеза резистентности РА, или RAP гипотеза (Rheumatoid Arthritis Protective hypothesis) [18]. Согласно этой гипотезе, в молекуле DRB1, функция DERAА последовательности была не как части Р4 кармана, а как пептида, который может связаться с HLA-DQ молекулами и может быть узнан Т-регуляторными лимфоцитами (Treg+), которые подавляют индуцированные Т-клетки. Эта модель объясняет, почему DRB1*01:03 и *04:02-связанные гаплотипы не ассоциированы с РА, несмотря на носительство предрасполагающих DQ аллелей. Также DERAА-носительство DR β 1 цепей защищает против РА предрасположенности среди DQ5 позитивных индивидуумов и пересекается с прогрессированием заболевания среди DQ3 позитивных индивидуумов. Позднее D.Reviron классифицировал SE-негативные DRB1 аллели согласно электрическому заряду Р4 кармана и исследовал ассоциацию между отрицательным или нейтральным зарядом с резистентностью к РА [19]. Другой подход был предпринят De Vries, который предложил новую форму SE модели, в которой наличие последовательности AA в положении 67–74 (вместо 70–74) прогнозирует или восприимчивость, или защиту в развитии РА [20]. Но на сегодняшний день ни одна из существующих гипотез не может полностью объяснить сложные отношения между генами HLA и РА или ЮИА.

Таким образом, полученные материалы позволяют предполагать, что определенные гены и аллели HLA II класса вовлечены в патологический процесс аутоиммунных ревматических заболеваний, но пути реализации этого процесса различны. Носительство предрасполагающего гена не является показателем неизбежности развития РА или ЮИА, но при соответствующем воздействии определенных факторов может выступать как одна из причин развития аутоиммунного процесса.

Список литературы

- 1 Насонов Е.Л. Ревматоидный артрит как общемедицинская проблема // Тер. архив. — 2004. — № 5. — С. 5–7.
- 2 Зарецкая Ю.М., Леднев Ю.А. HLA 50 лет. — Тверь: Триада, 2008. — 152 с.
- 3 Руководство по детской ревматологии / Под ред. Н.А.Геппе, Н.С.Подчерняевой, Г.А.Лыскиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 720 с.
- 4 Glass D.N., Gianini E.H. JRA as a complex genetic trait // Arthritis. Rheum. — 1999. — Vol. 42. — P. 2261–2268.
- 5 Turesson C., Matterson E.L. Genetic of rheumatoid arthritis // Mayo Clin. Proc. — 2006. — Vol. 81(1). — P. 64–101.
- 6 Prahalad S., Glass D.N. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis // Pediatric Rheumatology. — 2008. — Vol. 6. — P. 11.
- 7 Winchester R., Dwyer E., Rose S. The genetic basis of rheumatoid arthritis. The shared epitope hapothesis // Rheum. Dis. Clin. North Am. — 1992. — Vol. 18. — P. 761–783.

- 8 Hollenbach J.A., Thompson S.D., Bugawan T.L., Ryan M., Sudman M., Marion M., Langefeld C.D., Thomson G., Erlich H.A., Glass D.N. Juvenile Idiopathic Arthritis and HLA Class I and Class II Interactions and Age-at-Onset Effects // *Arthritis & Rheumatism*. — 2010. — Vol. 62, No. 6. — P. 1781–1791.
- 9 Van der Horst-Bruinsma I.E., Visser H., Hazes J.M., Breedveld F.C., Verduyn W., Schreuder G.M. HLA-DQ-associated predisposition to and dominant HLA-DR-associated protection against rheumatoid arthritis // *Hum. Immunol.* — 1999. — Vol. 60. — P. 152–158.
- 10 Thomson W., Donn R. Genetic Epidemiology: Juvenile Idiopathic arthritis genetics — What's new? What's next? // *Arthritis Res.* — 2002. — Vol. 4. — P. 302–306.
- 11 Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2010. — Vol. 6. — P. 468–476.
- 12 Downing J., Guttridge M.G., Thompson J., Darke C. Five-locus HLA typing of hematopoietic stem cell donor volunteers using PCR sequence specific primers // *Genet. Testing.* — 2004. — Vol. 8, No. 3. — P. 209.
- 13 Morling N., Friis J., Fugger L., Geergsen J., Heilman C., Pedersen F.K., Bdum N., Svejgaard A. DNA polymorphism of HLA class II genes in pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis // *Tissue Antigens.* — 1991. — Vol. 38, No. 2. — P. 16–23.
- 14 Pascual M., Mataran L., Jones G. et al. HLA haplotypes and susceptibility to rheumatoid arthritis. More than class II genes // *Scand J. Rheumatol.* — 2003 — Vol. 32, No. 3. — P. 196.
- 15 Smerdel A., Ploski R., Flato B. Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is primarily associated with HLA-DR8, but not DQ4 on the DR8-DQ4 haplotype // *Ann. Rheum. Dis.* — 2002. — Vol. 61. — P. 354–357.
- 16 Harney S., Wordsworth B.P. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis // *Tissue Antigens.* — 2002. — Vol. 60. — P. 465–473.
- 17 Gorman J., David-Vaudey E., Pai M. et al. Particular HLA-DRB1 shared epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid vasculitis // *Arthritis and rheumatism.* — 2004. — Vol. 50, No. 11. — P. 3476–3484.
- 18 Zanelli E., Gonzalez-Gay M.A., David C.S. Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis // *Immunol. Today.* — 1995. — Vol. 16. — P. 274–278.
- 19 Reviron D., Perdriger A., Toussirot E., Wendling D., Balandraud N., Guis S. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* — 2001. — № 44. — P. 535–540.
- 20 Vos K., Van der Horst-Bruinsma I.E., Hazes J.M.W., Breedveld F.C. et al. Evidence for a protective role of the human leukocyte antigen class II region in early rheumatoid arthritis // *Rheumatology.* — 2001. — № 40. — P. 133–139.

Е.Б.Хромова, А.Л.Бурмистрова, Т.А.Суслова,
Т.В.Шилова, А.Ю.Пищальников, Д.К.Волосников

**Челябі облысының орыс популяциясының ересектерде
құяң артриттың дамуымен және балаларында ювенил идиопатия
артриттың II класс HLA гендерінің ассоциациясы**

Мақалада Челябин облысының орыстар популяциясында құяң артрит және ювенил идиопатия ауруларымен ауыратындарда II кластағы HLA гендердің DR, DQA1, DQB локустарды кездесетін жиілігінің өзгешеліктері зерттелген. Авторлар көрсетілген локустарда аутоиммунды ревматикалық ауруға шалдығудың дамуына бейімделген гендерді анықтады.

E.B.Khromova, A.L.Burmistrova, T.A.Suslova,
T.V.Shilova, A.Yu.Pishchal'nikov, D.K.Volosnikov

**Association of HLA class II genes in the development of rheumatoid arthritis
in adults and of juvenile idiopathic arthritis in children of the Russian population
of the Chelyabinsk areal**

The features of the gene frequency of loci HLA II class DR, DQA1, DQB in patients with rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in the population of Russian Chelyabinsk region were studied. In these loci identified susceptibility genes and resistance genes to autoimmune rheumatic diseases.

References

- 1 Nasonov E.L. *Ter. Archive*, 2004, № 5, P. 5–7.
- 2 Zaretskaya Yu.M., Lednev Yu.A. *HLA 50 years*, Tver: Triada, 2008. — 152 p.
- 3 *Guide to pediatric Rheumatology*, Ed. N.A.Geppe, N.S.Podchernyaeva, G.A.Lyskina, M.: Geotar-Media, 2011. — 720 p.

- 4 Glass D.N., Gianini E.H. *Arthritis. Rheum.*, 1999, 42, p. 2261–2268.
- 5 Turesson C., Matterson E.L. *Mayo Clin. Proc.*, 2006, 81(1), p. 64–101.
- 6 Prahallad S., Glass D.N. *Pediatric Rheumatology*, 2008, 6, p. 11.
- 7 Winchester R., Dwyer E., Rose S. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1992, 18, p. 761–783.
- 8 Hollenbach J.A., Thompson S.D., Bugawan T.L., Ryan M., Sudman M., Marion M., Langefeld C.D., Thomson G., Erlich H.A., Glass D.N. *Arthritis & Rheumatism*, 2010, 62(6), p. 1781–1791.
- 9 Van der Horst-Bruinsma I.E., Visser H., Hazes J.M., Breedveld F.C., Verduyn W., Schreuder G.M. *Hum. Immunol.*, 1999, 60, p. 152–158.
- 10 Thomson W., Donn R. *Arthritis Res.*, 2002, 4, p. 302–306.
- 11 Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010, 6, p. 468–476.
- 12 Downing J., Guttridge M.G., Thompson J., Darke C. *Genet. Testing*, 2004, 8(3), p. 209.
- 13 Morling N., Friis J., Fugger L., Geergsen J., Heilman C., Pedersen F.K., Bdum N., Svejgaard A. *Tissue Antigens*, 1991, 38(2), p. 16–23.
- 14 Pascual M., Mataran L., Jones G. et al. *Scand. J. Rheumatol.*, 2003, 32(3), p. 196.
- 15 Smerdel A., Ploski R., Flato B. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002, 61, p. 354–357.
- 16 Harney S., Wordsworth B.P. *Tissue Antigens*, 2002, 60, p. 465–473.
- 17 Gorman J., David-Vaudey E., Pai M. et al. *Arthritis and rheumatism*, 2004, 50(11), p. 3476–3484.
- 18 Zanelli E., Gonzalez-Gay M.A., David C.S. *Immunol. Today*, 1995, 16, p. 274–278.
- 19 Reviron D., Perdriger A., Toussiroit E., Wendling D., Balandraud N., Guis S. *Arthritis Rheum.*, 2001, 44, p. 535–540.
- 20 Vos K., Van der Horst-Bruinsma I.E., Hazes J.M.W., Breedveld F.C. et al. *Rheumatology*, 2001, 40, p. 133–139.

G.Zh.Zhomartova

*Ye.A.Buketov Karaganda State University
(E-mail: gulnaz.zhomartova@mail.ru)*

Tourism in the Republic of Kazakhstan: development problems and prospects

This article describes the research of current state and analysis of prospects for the tourism development in the Republic of Kazakhstan, including the following objectives solved: the basic theoretical aspects of tourism are studied; the value of tourist activity in the economy of the Republic of Kazakhstan is revealed; the structure of the tourism industry is studied and the potential of the tourism resources of the country is analyzed; the analysis of the factors influencing on the development of tourism in the country is carried out, the main directions and prospects of tourism development in the Republic of Kazakhstan are revealed. The study was performed on the basis of data from the Agency of Statistics of the Republic of Kazakhstan.

Keywords: tourism, Kazakhstan, types of tourism, tourism development, tourism services, tourism infrastructure, tourism industry, products of tourism, EXPO-2017.

The majority of experts believe that Kazakhstan is not fully using its capabilities to develop tourism, and yet an extensive international experience shows that the tourism industry is one of the most promising sectors of the economy. Tourism growth has to occur mainly due to the appearance of new visited areas, as traditional areas of the world tourism market have already reached the limits of recreational capacity. In this regard, Kazakhstan has a unique opportunity to occupy its niche in the global tourism market.

Kazakhstan, having a rich tourist and recreational potential, is characterized by insufficient level of tourism development. Its share in the gross domestic product is around 0.3 %. The data in table 1 shows that in 2011 volume of incomes from tourism activities made up 145.3 billion tenge, which is 2 times higher than in 2008 (77.6 billion). Paid taxes to the budget of the republic made up \$20,6 billion. The number of people employed in the industry was 158 700 [1].

Table 1

Analysis of the tourism industry development for the period of 2008–2011

Indicators	2008	2009	2010	2011
Income from tourism activities, billion tenge	77,6	82,6	97	145,3
Allocated capital investments in tourism, million tenge	231,2	104,5	143,7	178,9

Investments in the fixed assets in tourism totaled 143.7 billion tenge in 2010, 178.9 billion tenge in 2011. It should be noted that the investment in fixed assets in the sectors producing goods and providing services, tends to rise. The quantitative measures of tourism industry growth show progressive and sustainable industry trends (table 2).

Table 2

The dynamics of the tourism industry for the period 2009–2011

Indicators	2009	2010	2011
The number of travel companies, units	1203	1252	1 567
The number of served visitors, people	347 413	459 337	601 521
The amount of the executed works and services, thousand tenge	58 653,9	101 844,4	78 483,5

According to the data shown in table 2, at the end of 2011 the republic had 1,567 tourism organizations and 601,521 people have been served by travel agencies, that is more than in the previous year for 23.6 % (459 337 people in 2010). Total volume of services rendered in 2011 increased in comparison with 2009 by 25.3 % and amounted to 78 483.5 thousand tenge [1].

By analyzing the variation of the main economic indicators of tourism development, it can be concluded that the potential of Kazakhstan's tourism is not fully realized as the development of the tourism industry depends on the creation of a modern competitive tourist complex, including the infrastructure of transport and logistics system, also taking into account the reconstruction of the crossing points through the state border of the Republic of Kazakhstan (road, air, rail), providing ample opportunities to meet the needs of local and foreign citizens in tourism services. Creating a tourist complex will also make a significant contribution to the economy through tax revenues, foreign exchange inflows, increasing the number of jobs, as well as providing control over the conservation and management of cultural and natural heritage.

Recently there has been a significant increase in the interest of foreign tourists in the tourist attractions of the Republic of Kazakhstan. This phenomenon, first of all, is caused by the geographical location of the republic, a great potential in the field of attractive tourist routes, etc. Tourist attraction of Kazakhstan is due to the presence of unique natural areas and nature reserves, historic and cultural attractions on world level. Proper use of these resources contributes to the development of almost all types of tourism in the country.

The graph shown in figure 1 shows that the average annual increase in tourism activity range 2 % per year. So, for the period from 2008 to 2011, the number of tourists served increased from 473,900 people nearly 1.3 times and amounted to 601,500 people.

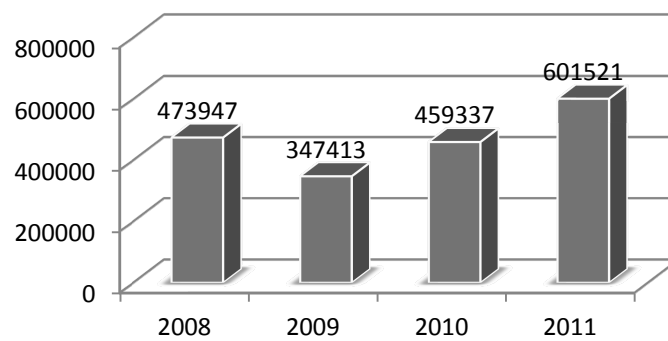


Figure 1. Served visitors by type of tourism (people)

In the structure of tourist activity, domestic tourism made up 32.2 %, inbound tourism — 5.7 %, outbound tourism — 62.1 %. If compare these figures with the data in 2010, then an increase in outbound tourism from 56.4 % to 62.1 %, a reduction in domestic 35.4 % to 32.2 % in the overall structure of tourist services (fig. 2) is observed [1]. Analysis of inbound tourism flows in Kazakhstan shows that the country is not sufficiently attractive for foreign tourists, and therefore the number of tourists arriving in the country, far behind the pre-crisis levels.

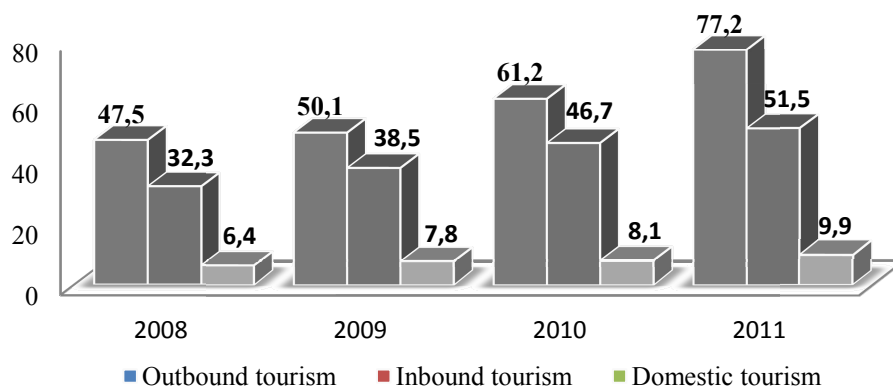


Figure 2. The specific structure of the tourism industry of the Republic of Kazakhstan (%)

Currently, the share of outbound tourism is much higher than the proportion of inbound and outbound tourism. And they have been known to bring the main income from this sector of the economy to domestic GDP. Today, about 750 travel companies that cooperate with the 80 countries of the world operate in the country. And only about 20 % of them provide services on attracting tourists to the country and on domestic tourism (fig. 3) [1].

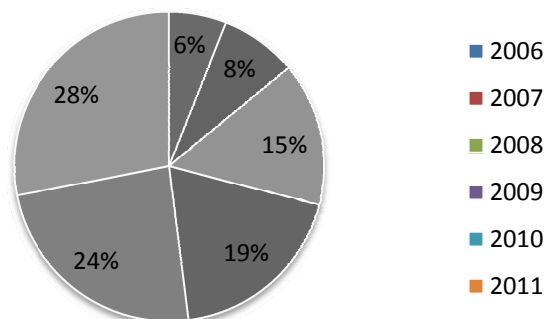


Figure 3. The number of travel companies in the republic of Kazakhstan (%)

The next type, indicating the level of tourism industry development of the country is inbound tourism. The total number of foreign residents who entered Kazakhstan in 2011 amounted to 5,685,132, which is more for 20.6 % than in 2010 (fig. 4) [1]. Most foreign residents come from three neighboring countries: the Republic of Uzbekistan (34.0 %), the Kyrgyz Republic (27.1 %) and the Russian Federation (23.7 %). The main reasons for their visit were private (76.9 %) and transit trips (17.0 %), while business travel and tourism for the purpose of leisure and recreation made up 6.1 %. Many foreign visitors entering the republic stay with their families or friends, they travel by transit or day-trippers. Most visitors from the Republic of Uzbekistan and the Kyrgyz Republic are migrant workers.

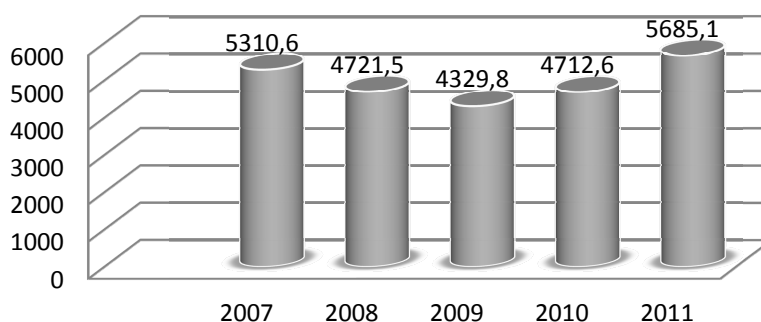


Figure 4. The number of tourists who entered the Republic of Kazakhstan (thousand people)

The number of visitors for outbound tourism was 8,020,400 in 2011, which is more for 8.2 % than in 2010. Such volumes of outbound tourism contribute to the formation of negative tourism balance (more than 422 million U.S. dollars) in the balance of payments of the country. Kazakhstan remains «a tourist donor» for countries such as the republic of Turkey, China, the United Arab Emirates, the Kingdom of Thailand, where the tourism industry is developing rapidly creating new jobs and improving the structure of the balance of payments and increasing the well-being of the population (table 3).

Table 3

The number of tourists entering and leaving Kazakhstan

Year	Leaving tourists (people)	Inward tourists (people)
2007	4 544 440	5 310 582
2008	5 242 643	4 721 456
2009	6 413 943	4 329 848
2010	7 412 300	4 712 657
2011	8 020 400	5 685 132

The share of domestic tourism. According to the Agency on Statistics of the Republic of Kazakhstan, the share of domestic tourism has increased in 2007, while travel companies served 89.3 million tourists, this figure increased to 150 thousand people in 2009. Among all types of tourism share of domestic one reached up to 24 %.

Today's situation of the domestic tourism in the market is characterized by the following factors: the demand for tourist services in Kazakhstan is limited by material possibilities of citizens, few camping sites that provide a sufficient level of comfort. Inconsistency of interests in the relationships of the internal market tour operators and spa complex enterprises in the country leads to dissatisfaction with the needs of Kazakhstani citizens. Each year, the amount of buying the vouchers increases by an average of 5 %, and in 2009 reached a size of 376 million tenge. Income of the Republic of Kazakhstan from travel agencies' activities on internal tourism is increasing every year by an average of 2.3 % and in 2011 made up 1,035 million tenge.

Thus, a sustained and sustainable development of Kazakhstan's tourism is confirmed by the pace of inbound and outbound tourism growth. The greatest development of domestic tourism is observed in Astana, Almaty, and East Kazakhstan, Karaganda, Almaty and Akmola oblasts. The outbound tourism is the most developed one in Almaty, Karaganda, North Kazakhstan and West Kazakhstan oblasts.

In Kazakhstan, the main directions of development of the tourist industry as a form of tourism clusters to improve the competitiveness in the tourism market at the expense of synergetic effect are decided. Five tourism clusters: Astana, Almaty, East Kazakhstan, South Kazakhstan and West Kazakhstan can be created in the country.

Every tourism cluster should organize the development of several tourist products, it is necessary to develop six major tourism products in the Republic of Kazakhstan: «MICE-tourism», «Cultural tourism and tour», «Active and adventure holidays», «Holidays in the mountains and on the lakes», «Beach tourism» and «Short stay» [2].

The development of tourism products above mentioned implies the need for development of various tourism projects, so such major projects of national importance like health-resort zone Burabay in the cluster Astana, ski resort South Kaskelen and Kok Zhaylau in the cluster Almaty, Buhtarma — Katon-Karagay in the cluster East Kazakhstan and Kenderli in the cluster West Kazakhstan are initiated by the Government of the Republic of Kazakhstan.

It is encouraging to note the fact that putting in a claim for hosting EXPO-2017, Kazakhstan has fully used its considerable experience in the implementation of important international initiatives. For instance, the chairmanship of the OSCE in 2010, in the OIC in 2011–12., the convocation of the Congress of World and Traditional Religions (2003, 2006, 2009, 2012), the organization of Winter Asian Games in 2011 and the annual Astana Economic Forum. Kazakhstan's multiple view foreign policy is successful in the form of good relations with major world powers such as the U.S.A, China, Russia, the EU, but also with the countries of Asia and the Asia Pacific region [3].

Selection of Astana as the host of EXPO 2017 will bring new opportunities for the revitalization and development of European and Asian countries. Well-chosen theme of the exhibition allows to introduce the latest technology in the field of clean energy and to consider the possibilities of its use in a country rich in oil, gas and uranium. The geopolitical location of Kazakhstan and its foreign policy, of course, will continue to strengthen cooperation with the states, both east and west of the Great Steppe.

Thus, foregoing data demonstrate the increasing role of international tourism in the economy of Kazakhstan at the moment, and the prospects for the development of tourism in the near future.

The following proposals for the use of the results of this work, as well as suggestions on further implementation of the work in this direction are put forward:

- creation of prerequisites for the opening of small travel companies that have the human and material resources that promotes investments in the tourism sector;
- development of transport infrastructure. Increasing the number of both scheduled and charter flights. The development of tourism is limited by high transport costs; therefore it is necessary to create conditions for the opening of specialized transport companies for tourist activities. Moreover, it is necessary to establish a system of electronic booking and travel planning;
- statistical record keeping in accordance with international standards and complex impartial record of the economic effects from tourism activities;
- training the qualified personnel for the tourism industry appropriate to the international standards of modern education;
- raising the level of funding the tourism development in the regions.

In conclusion, it should be noted that in order to for tourism industry to become highly profitable, as world experience in tourism development shows, it is necessary to consolidate the efforts of all participants in the tourist market, the public and private sectors. And here the role of the Government of the Republic is to coordinate policy development and planning in the tourism industry at the international, national and private levels.

With comprehensive solution of all problems outlined above, no doubt, the creation of a competitive tourism industry capable of business cooperation within the framework of international trade in services in the field of tourism and recreation will be provided in the coming years.

References

- 1 Туризм Казахстана: Стат. сб. Агентства РК по статистике, 2007–2011. — Астана, 2012.
- 2 Концепция развития туристской отрасли Республики Казахстан до 2020 года. Постановление Правительства Республики Казахстан от 28 февраля 2013 года № 192.
- 3 www.nomadic.kz

Г.Ж.Жомартова

Қазақстан туризмі: даму мәселелері мен келешегі

Мақалада Қазақстан Республикасының туристік саласының қазіргі жағдайы мен даму болашағының талдауы көрсетілді, соның ішінде келесі міндеттер шешілді: туризмді дамытудың теориялық негіздерін зерделеу; туристік әрекеттің ҚР экономикасындағы мәнін анықтау; туристік саланың құрылымын зерттеу және елдің туристік ресурстарының әлеуетіне талдау жасау; республикада туризмнің дамуына әсер етуші факторларға талдау жасау; ҚР туризмді дамытудың басты бағыттары мен болашағын анықтау. Зерттеу Қазақстан Республикасы Статистика агенттілігінің мәліметтері негізінде жасалған.

Г.Ж.Жомартова

Туризм в Казахстане: проблемы и перспективы развития

В статье даны исследование современного состояния и анализ перспектив развития туризма в Республике Казахстан, в том числе были решены следующие задачи: изучены основные теоретические аспекты туризма; раскрыто значение туристской деятельности в экономике Республики Казахстан; исследована структура туристской отрасли и проанализирован потенциал туристских ресурсов страны; проведен анализ факторов, оказывающих влияние на развитие туризма в республике; выявлены основные направления и перспективы развития туризма в Республике Казахстан. Исследование выполнено на основе данных Агентства статистики РК.

References

- 1 Tourism of Kazakhstan. Statistical collection of the Agency of Statistics of the Republic of Kazakhstan, 2007–2011, Astana, 2012.
- 2 Concept of tourism development in the Republic of Kazakhstan to 2020. Provision of Government of the Republic of Kazakhstan from February, 28, 2013, № 192.
- 3 www.nomadic.kz

АВТОРЛАР ТУРАЛЫ МӘЛІМЕТТЕР СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Akleyev, A.V.** — Doctor of biological sciences, Professor, Honored Worker of Science, Director of the Urals Research Center for Radiation Medicine (UNPTRM), Head of the Department of Radiation Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Russia.
- Aitkulov, A.M.** — Candidate of biological sciences, Docent, Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Andreyeva, S.V.** — Assistant professor of microbiology, Faculty of biology, Chelyabinsk State University, Russia.
- Atamanyuk, N.I.** — Candidate of Biological Sciences, a Research fellow, Experimental department of the Urals Research Center for radiation medicine, Chelyabinsk, Russia.
- Bakhareva, L.I.** — Candidate of medical sciences, Docent of Department of microbiology, Faculty of biology, Chelyabinsk State University, Head of the bacteriological laboratory MBUZ City clinical hospital No. 6, Chelyabinsk, Russia.
- Burmistrova, A.L.** — Doctor of medical sciences, Professor, Dean of biological faculty, Chelyabinsk State University, Russia.
- Chernova, M.S.** — Department of microbiology, Faculty of biology, Chelyabinsk State University, Russia.
- Dolgushin, I.I.** — Chancellor, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Corresponding member of the Academy of Medical Sciences, Doctor of medical sciences, Professor, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation.
- Donov, P.N.** — Department of microbiology, Faculty of biology, Chelyabinsk State University, Russia.
- Ivanov, I.I.** — Candidate of technical sciences, Head of the CPL PO «Mayak», Chelyabinsk Region, Ozersk, Russia.
- Ivanova, Ye.L.** — Lecturer of internal medicine department, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.
- Khromova, E.B.** — Assistant of the Department of microbiology, Biology faculty, Ph.D. of biological sciences, Chelyabinsk State University, Russia.
- Kikimbaeva, A.A.** — Doctor of medical sciences, Astana Medical University.
- Kohnert, K.-D.** — Director on science, Doctor of biological sciences, Doctor of medical sciences, Institute fur Diabetes «Gerhardt Katsch», Karlsburg, Germany.
- Kolesnikov, O.L.** — Head of the Department of biology, Doctor of medical sciences, Professor, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation.
- Kolesnikova, A.A.** — Associate professor, Department of hospital therapy No. 1, Candidate of medical sciences, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation.
- Konovalov, A.V.** — Head of Laboratory 22 CFL PO «Mayak», Chelyabinsk Region, Ozersk, Russia.
- Konovalova, A.A.** — Senior teacher, Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Makisheva, S.** — Student, Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Meqramov, G.G.** — Doctor of medical sciences, Professor, Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Meqramova, A.G.** — Candidate of medical sciences, Karaganda State Medical University.
- Mukasheva, M.A.** — Professor of Department of physiology, Doctor of biological sciences, Ye.A.Buketov Karaganda State University.

- Nohkrin, D.Yu.** — Candidate of biological sciences, Docent of microbiology and biology department of Chelyabinsk State University, Russia.
- Pishchalnikov, A.Yu.** — Professor, Doctor of medical sciences, Professor of Department of hospital pediatrics, clinical immunology and allergology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.
- Pogosyan, G.P.** — Candidate of biological sciences, Docent, Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Pryakhin, E.A.** — Candidate of biological sciences, Head of the experimental department of the Urals Research center for radiation medicine, Professor of bio-ecology of biological faculty of the Chelyabinsk State University, Russia.
- Shilova, T.V.** — Postgraduate, Department of hospital pediatrics, clinical immunology and allergology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.
- Stashkevich, D.S.** — Docent of microbiology department, Candidate of biological sciences, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.
- Suslova, T.A.** — Lecturer of the Department of microbiology, Biology faculty, Ph.D. of medical sciences, Chelyabinsk State University, Russia.
- Tarabrina, Yu.O.** — Post-graduate student Department of microbiology, virology, immunology and clinical laboratory diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.
- Timofeyeva, S.V.** — Department of microbiology, Faculty of biology, Chelyabinsk State University, a biologist at the Immunotyping of tissue Laboratory, OGUP Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station.
- Tryapitsyna, G.A.** — Doctor of medical sciences, Docent of Department of radiobiology of the biological faculty of the Chelyabinsk State University, a Leading researcher at the experimental department of the Urals Research center for radiation medicine, Chelyabinsk, Russia.
- Urzhumov, P.V.** — Department of microbiology, Faculty of biology, Chelyabinsk State University, Russia.
- Volosnikov, D.K.** — Professor, Doctor of medical sciences, Dean of the Faculty of pediatrics, Head of the Department of hospital pediatrics, clinical immunology and allergology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk.
- Wolters, G.** — Doctor of medical sciences, Department of Surgery, University of Groningen, the Netherlands.
- Zaripova, O.N.** — Department of microbiology, p. lecturer in the Faculty of biology bioecology, Chelyabinsk State University, Russia.
- Zhomartova, G.Zh.** — Master of geography, Teacher, Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Blinova, E.A.** — Chelyabinsk State University, Russia.
- Zhumasheva, K.A.** — Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Zholbolsynova, A.S.** — Professor, Doctor of chemical sciences, Department of Organic Chemistry and Chemistry of Macromolecular Compounds, North Kazakhstan State University named after M. Kozybayev, Petropavlovsk.
- Kazhmuratova, A.T.** — Docent, Candidate of chemical sciences, Department of Organic Chemistry and Polymers, Ye.A.Buketov Karaganda State University.
- Dzhemaledinova, I.M.** — Senior lecturer in «Agriculture» Department, Candidate of agricultural sciences, North Kazakhstan State University named after M. Kozybayev, Petropavlovsk.
- Doshchanov, D.E.** — Lecturer, Department of General Biology, North Kazakhstan State University named after M. Kozybayev, Petropavlovsk.
- Valitov, D.A.** — Senior lecturer in «Agriculture» Department, Candidate of chemical sciences, North Kazakhstan State University named after M. Kozybayev, Petropavlovsk.
- Bektemisova, A.U.** — Docent, Candidate of chemical sciences, Department of Organic Chemistry and Chemistry of Macromolecular Compounds, North Kazakhstan State University named after M. Kozybayev, Petropavlovsk.
- Belyayeva, S.V.** — Chelyabinsk State University, Russia.
- Anan'yeva, I.P.** — Antituberculous dispensary number 3, Chelyabinsk, Russia.