

О. Утевська, канд. біол. наук, Л. Атраментова, д-р біол. наук
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна,
О. Балановська, д-р біол. наук
ФГБНУ "Медико-генетичний науковий центр", Москва, Росія,
О. Балановський, д-р біол. наук
Інститут загальної генетики імені М.І. Вавилова РАН, Москва, Росія

МІНЛИВІСТЬ STR ЛОКУСІВ Y-ХРОМОСОМИ В ПОПУЛЯЦІЯХ УКРАЇНЦІВ

Отримано частоти гаплотипів за 17 STR локусами Y-хромосоми для 1151 зразка ДНК корінних українців з 13 обласних популяцій, що представляють основні територіальні підрозділи України. Міжпопуляційні відмінності за сукупністю досліджених Y-STR маркерів не є значущими. Внутрішньоукраїнська диференціація найбільш виражена між групами популяцій, що представляють Полісся, правобережний та лівобережний лісостеп. Найбільш висока дисперсія мікросателітних повторів спостерігається по краях етнічного українського ареалу – на Закарпатті, Буковині, Слобожанщині, найнижча – в Поліссі. Значення гаплотипічної різноманітності в середньому вище в степовій і лісостеповій зонах, ніж у Поліссі або Карпатах. Загальна гаплотипічна різноманітність $HD = 0,998855$, ймовірність збігу гаплотипів у двох випадково взятих з популяції неспоріднених чоловіків $MP = 0,00114508$, потужність дискримінації $DC = 0,89400521$.

Ключові слова: українці, Y-хромосома, STR маркери, гаплотипічна різноманітність.

O. Utevska, PhD., L. Atramentova, DSc
V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine,
E. Balanovska, DSc,
Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia,
O. Balanovsky, DSc
Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

Y-CHROMOSOME STR VARIATION IN UKRAINIAN POPULATIONS

The haplotype and allele frequencies for 17 STR loci of Y-chromosome were obtained for 1151 indigenous Ukrainians from 13 regional populations representing the major territorial subdivisions of Ukraine. There were no significant inter-population differences. The genetic subdivisions within Ukraine was revealed between Polesie, western and eastern forest-steppe populations. The highest microsatellite variability was observed along the edges of Ukrainian area – in the Carpathian region, Bukovina, Sloboda Ukraine; the lowest – in Polesie. The average haplotype diversity values are higher in the steppe and forest-steppe zones, than in Polesie and the Carpathians. Forensic parameters were calculated: total haplotype diversity $HD = 0,998855$, match probability $MP = 0.00114508$, the discrimination capacity $DC = 0,89400521$.

Keywords: Ukrainians, Y-chromosome, STR markers, haplotype diversity.

УДК 616.61-008-092:541.182.024-032.35-032.81:612.08

В. Лавриненко, пошукач, Ю. Чайковський, д-р мед. наук, Л. Дегтярьова, д-р мед. наук.
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ

БІОЛОГІЧНИЙ ВПЛИВ АЛМАЗНИХ НАНОЧАСТОЧОК ТА ТЕХНІЧНОГО ВУГІЛЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК КУРЯЧИХ ЕМБРІОНІВ

Визначали біологічний вплив нанорозмірних матеріалів на нирки курячих зародків, одержаних при інкубуванні яєць лінії Хай-Лайн білий. Суспензію алмазних наночастинок та технічного вугілля на біосумісному декстрані вводили у жовтковий мішок зародків на 3 добу інкубації і проводили оцінку стану тканин нирок на 14 і 20 добу інкубації. За однакових умов з експериментальними групами інкубували яйця з контрольної групи, яким здійснювали введення декстрану без жодних домішок. Показано альтеруючий вплив обох досліджуваних матеріалів на органи виділення зародків. Вони спричиняють набряки, дистрофії, утворення кальцинатів. Статистично продемонстровано збільшення площі епітелію ниркових каналців в експериментальних групах у зв'язку з розвитком білкової дистрофії та набряків епителиоцитів.

Ключові слова: алмазні наночастинок, технічне вугілля, токсичний ефект.

Вступ. Дослідження у галузі нанорозмірних матеріалів демонструють значні переваги їх застосування у багатьох галузях медицини і промисловості. Одним з перспективних щодо діагностики і лікування матеріалів є алмазні наночастинок (АНЧ). Це пов'язано з їхніми унікальними характеристиками – біосумісністю, низькою хімічною реактивністю, оптичною прозорістю, надзвичайною міцністю тощо [1, 2, 3]. Пропонують застосування АНЧ в якості біосенсорів, переносників ліків, засобів візуалізації певних структур чи іммобілізації білків тощо [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Розуміння базових принципів і особливостей впливу цих структур на живі організми, тропності до певних структур та органів є абсолютно необхідними для їх подальшого медичного і біологічного застосування. Тим не менше, наукових досліджень на цю тему в рази менше ніж тих, що описують все нові і нові потенційні сфери застосування АНЧ.

Більшість досліджень патологічних ефектів технічного вугілля (сажі) стосується потенційних ризиків для здоров'я при згоранні дизельного палива та фабричних емісій, де окрім нього міститься велика кількість інших речовин. До того ж, практично невисвітленим на сьогоднішній день [9] лишилось питання впливів сажі на різні

системи організму, бо основну увагу дослідники зосереджують на легенях та шкірі.

На жаль, значна частина авторів, що заперечують канцерогенну чи будь-яку іншу патогенну дію сажі на живі організми, спирається на фрагментарне сприйняття її властивостей [10, 11]. Автори вважають, що сажа майже повністю складається з карбону, вона ніяким чином не включається в метаболізм і після інгаляції з часом просто виводиться з організму за допомогою мукоциліарного транспорту. Вочевидь така інтерпретація біологічних ефектів сажі не зовсім коректна, що ми і спробуємо довести результатами цього дослідження.

Матеріали і методи. В якості об'єкту дослідження було обрано курячі ембріони породи Хайлайн білий (бройлери). Використана біологічна модель розроблена за методикою В.П. Терещенко, патент України №49464. Курячий ембріон перебуває під потужним захистом від екзогенних впливів, тож є дуже зручним для вивчення різноманітних потенційно шкідливих речовин (медикаментів, пестицидів тощо) [12]. В експерименті було задіяно 114 яєць, розділених на 3 групи: одну контрольну (53 яйця) та дві експериментальні. Зародкам з експериментальних груп вводили алмазні наночастинок (34 яйця) та технічне вугілля (27 яєць).

Досліджувані матеріали вводили в жовтковий мішок ембріона, оскільки саме з нього організм отримує всі поживні речовини. Для забезпечення потрапляння матеріалу саме в жовтковий мішок і запобігання пошкодження як самого зародка, так і його провізорних органів, яйця на певний час розміщували горизонтально, щоб зародковий диск розмістився на поверхні жовтка, і під фіксованим кутом вводили голку на визначену довжину. Для підтримання замкнутості внутрішнього середовища яйця отвір від введення матеріалу заліплювали воском.

Доза досліджуваних матеріалів складала 0,31 мг на одне яйце.

Разова підтримуюча доза активованого вугілля для дорослої людини вагою 70 кг складає 1,0 г. З урахуванням середньої ваги жовтка яйця (22 г) ми вираховували дозу для введення у жовтковий мішок зародка:

$$22 \times 1:70 \ 000 = 0,31 \text{ мг}$$

Оскільки вводити дані матеріали в організм в сухому вигляді неможливо, необхідно було підібрати розчинник. Зазвичай з даною метою використовують біосумісні рідини, тобто ті, що за своїми властивостями і хімічним складом наближені до рідин, котрі містяться в живих організмах. Ми зупинили свій вибір на Реополіглюкіні-Новофарм (Декстрані 40).

Технічне вугілля і НА було введено в об'ємі 0,2 мл декстрану на один жовток. Кількість рідини, що вводилася є допустимою для введення у експериментах з курячими зародками.

Стерилізація матеріалу здійснювалась за t° 120 $^{\circ}$ C впродовж 60 хвилин.

Всі групи яєць інкубувались в абсолютно однакових умовах – в одному побутовому інкубаторі моделі Термія-60 за однакових вологості і температури (37,5 – 38,5 $^{\circ}$ C).

Введення матеріалу проводилось на 3 добу інкубації, що обумовлено строками розвитку кровоносної системи зародків. Забір матеріалу для гістологічних досліджень проводили на 14 і 20 добу інкубації. Ми акцентували увагу саме на нирках, оскільки вони забезпечують виведення різноманітних шкідливих речовин. Тож цілком логічно припустити, що досліджувані матеріали, які

було введено зародкам, матимуть спорідненість саме до цих органів.

Матеріал для подальших морфологічних досліджень фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. З парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 4-6 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином. Зрізи переглядали під мікроскопом при збільшеннях 10 $\times$ 10 та 10 $\times$ 40.

Нами було також виміряно та статистично оброблено дані щодо площі епітелію прямих і звивистих каналців у нирках зародків з контрольної та експериментальних груп. Вимірювання проводились за допомогою комп'ютерної програми ImageJ. Було встановлено, що розподіл по обох показниках у всіх трьох групах був ненормальним (не відповідав кривій Гаусса). Тому в якості методу статистичної перевірки гіпотез ми обрали U-критерій Манна-Уїтні.

Результати і обговорення. На гістологічних препаратах нирок зародків з контрольної групи патології виявлено не було. Епітелій прямих і звивистих каналців нирок курячих ембріонів на пізніх стадіях інкубації не мав ознак набряків в базальній чи апікальній зонах; білкової чи жирової дистрофії також не спостерігалось. В порожнинах каналців були відсутні сторонні включення, кальцифікати чи відлучені клітини епітелію, інтерстиційних набряків також не було.

Дослідження тканин нирок у зародків з групи із введеною сажею показало наявність значних патологічних змін. Епітелій каналців набряклий в апікальній і базальній частинах (рис. 1). Місцями навіть зустрічались розриви плазмолем епітеліоцитів, хоча у прямих каналцях ушкодження менші, ніж у звивистих. За рахунок набряків у базальній частині клітин ядра зміщені апікально до просвітів каналців. Самі просвіти звужені, в них присутні еритроцити, фрагменти клітин епітелію. Також в каналцях зустрічались крупні гомогенні кальцифікати, що свідчить на користь порушення іонного обміну. В епітеліоцитах ознаки білкової дистрофії – зернистість в цитоплазмі.

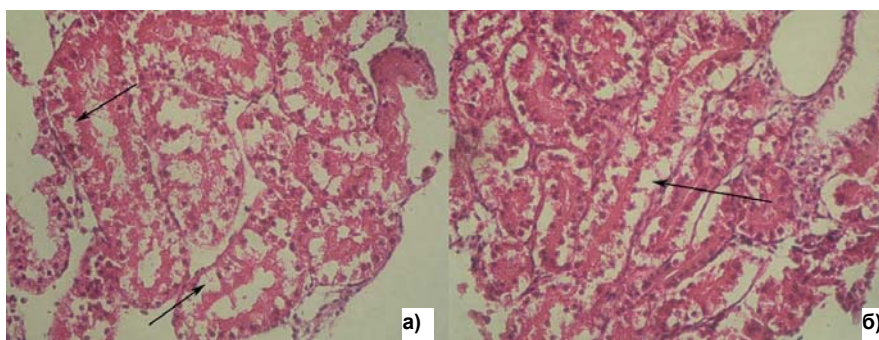


Рис. 1. Мікрофотографія зрізу нирки курячого ембріона 14-денного строку інкубації з групи із введеною сажею.

**Набряк в апікальній (а) та базальній (б) частинах епітелію (стрілки).
Забарвлення гематоксиліном і еозином, об. 40х, ок. 10х.**

Дослідження нирок зародків із групи з введеними АНЧ показало наявність запальних реакцій, про які свідчило проникнення в тканини полінуклеарних імунних клітин. В каналцях спостерігались дистрофічні зміни: епітеліоцити набрякли, субклітинні вакуолі зливались між собою. В деяких ділянках звивистих каналців навіть спостерігалась десквамація епітелію. В окремих

каналцях зустрічались еритроцити, що є свідченням гематурії та накопичення фільтрату білкової природи, що вказує на порушення процесів фільтрації чи реабсорбції. Присутній також інтерстиційний набряк – каналці розділені набряковою рідиною. В їхніх просвітах зустрічались злучені клітини і різномірний вміст. В цій групі також спостерігались кальцифікати (рис.2).

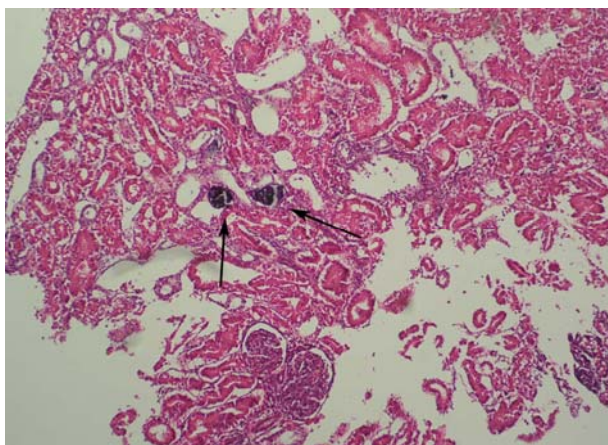


Рис. 2. Мікрофотографія зрізу нирки курячого ембріона 20-денного строку інкубації із введеними АНЧ. Кальцифікати в порожнинах каналців (стрілки).
Забарвлення гематоксилином і еозином, об. 10х, ок. 10х.

У підсумку варто відзначити, що за даними гістологічних досліджень як технічне вугілля, так і алмазні наночасточки мають очевидний альтеруючий вплив на органи виділення зародка. Вони спричинюють набряки, дистрофії, утворення кальцинатів.

Результати статистичної обробки одержаних нами даних щодо площі прямих і звивистих каналців у контрольній та експериментальних групах представлено у таблицях 1 – 2.

Таблиця 1. Порівняльний аналіз площі епітелію звивистих каналців в контрольній та експериментальних групах

Групи	Показники					
	Медіана, мкм2	Максимальне значення, мкм	Мінімальне значення, мкм2	U-критерій Манна-Уїтні	Критичне значення U-критерію Манна-Уїтні	Наявність достовірної різниці між групами
Контрольна група	11221,9	17430,4	5399,5			
Експериментальна група із введеними АНЧ	28153,2	72229,9	9864,4	92	1010	Наявна*
Експериментальна група із сажею	32380,2	70551,9	15655,0	5	1010	Наявна*
				1305	1010	Відсутня**

Тут і далі * – наявність чи відсутність достовірної різниці між інтактною та експериментальною групами при $p \leq 0,05$

** – наявність чи відсутність достовірної різниці між експериментальними групами при $p \leq 0,05$

Таблиця 2. Порівняльний аналіз площі епітелію прямих каналців в інтактній та експериментальних групах

Групи	Показники					
	Медіана, мкм2	Максимальне значення, мкм2	Мінімальне значення, мкм2	U-критерій Манна-Уїтні	Критичне значення U-критерію Манна-Уїтні	Наявність достовірної різниці між групами
Контрольна група	3543,7	6445,2	1291,1			
Експериментальна група із введеними АНЧ	11692,5	27575,4	3355,4	75	628	Наявна*
Експериментальна група із введеною сажею	8068,5	13313,5	2988,4	85	645	Наявна*
				500	645	Наявна**

На основі статистичного аналізу даних з усіх трьох груп можна говорити про достовірне збільшення загальної площі ниркового епітелію як у прямих, так і у звивистих каналцях у експериментальних групах відносно контрольної. Імовірно, це пов'язано з наявністю апікальних і базальних набряків у епітеліоцитах, які значною мірою збільшили їх площу і є свідченням негативного впливу досліджуваних матеріалів на нирки зародків.

Також цікавим є те, що статистично достовірну різницю було виявлено і між експериментальними групами – площа прямих каналців у групі із введеними АНЧ є більшою, ніж у групі з технічним вугіллем, що підтверджує потужність їх токсичної дії.

Висновки.

1. За даними світлової мікроскопії встановлено здатність технічного вугілля (сажі) та алмазних наночастинок проникати крізь клітинні і судинні мембрани та згодом мігрувати в живому організмі.

2. За даними комплексних досліджень встановлено, що технічне вугілля і алмазні наночастинок чинять альтеруючий вплив на органи виділення зародка. Вони спричинюють дистрофічні зміни паренхіматозних клітин з утворенням кальцинатів в нирках.

3. Статистично продемонстровано збільшення площі епітелію ниркових каналців в експериментальних групах у зв'язку з розвитком дистрофії і набряків епітеліоцитів.

Виявлені нами патологічні процеси в тканинах курячих ембріонів, які зазнали дії технічного вугілля та алмазних наночастинок, засвідчують можливість їхнього тератогенного впливу на живі організми.

Список використаної літератури

1. Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice / Y. Yuan [et al.] // Diamond and Related Materials. – 2010. – P. 291 – 299.
2. Nanometer-Sized Diamond Particle as a Probe for Biolabeling / J-I Chao [et al.] // Biophysics Journal. – 2007. – № 93(6). – P. 2199–2208.

3. Biodistribution and fate of nanodiamonds in vivo / Y Yuan [et al.] // Diamond and related materials. – 2009. – № 18(1). – P. 95 – 100.
4. Vajayanthimala V. Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications / V. Vajayanthimala, H-C. Chang // Nanomedicine London England. – 2009. – № 4(1). – P. 47 – 55.
5. Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications / T.-L. Wee [et al.] // Diamond and Related Materials. – 2009. – № 18(2-3). – P. 567-573.
6. Polymer-functionalized nanodiamond platforms as vehicles for gene delivery / X. Q. Zhang [et al.] // ACS Nano. – 2009. – № 22(3). – P. 2609 – 2616.
7. Nanodiamond-insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles / R.A. Shimkunas[et al.] // Biomaterials. – 2009. – № 30(29). – P. 5720–5728.
8. Barnard A. Diamond standard in diagnostics: nanodiamond biolabels make their mark // Analytical. – 2009. – № 134(9). – P. 1751 – 1764.

9. Robertson J Case-control Study of Circulatory, Malignant and Respiratory Morbidity in Carbon Black Workers in the USA / J Robertson, T Ingalls // American Industrial Hygiene Association Journal. – 1989. – № 50(10). – P. 510 – 515.
10. Ingalls T Periodic Search for Cancer in the Carbon Black Industry / T Ingalls, R. Risques-Iribarren // Archives of Environmental Health. – 1961. – № 2. – P. 429 – 433.
11. Ingalls T. Incidence of Cancer in the Carbon Black Industry // Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine. – 1950. – № 1. – P. 662 – 676.
12. Кузнецов А. Ветеринарный медицинский справочник / А. Кузнецов. – Санкт Петербург : Лань, 2004.

Надійшла до редколегії 22.12.15

В. Лавриненко, соискатель, Ю. Чайковский, д-р мед. наук, Л. Дегтярева, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ АЛМАЗНЫХ НАНОЧАСТИЧЕК И ТЕХНИЧЕСКОГО УГЛЯ НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

Определяли биологическое влияние наноразмерных материалов на почки куриных эмбрионов, полученных при инкубации яиц линии Хай-Лайн белый. Суспензию алмазных наночастичек и технического угля на биосовместимом декстрате вводили в желточный мешок зародышей на 3 сутки инкубации и проводили оценку состояния тканей почек на 14 и 20 сутки инкубации. При одинаковых условиях с экспериментальными группами инкубировали яйца из контрольной группы, которым производили введение декстрата без примесей. Продemonстрировано альтерирующее влияние обоих исследуемых материалов на органы выделения зародышей. Они вызывают отеки, дистрофию, образование кальцификатов. Статистически продemonстрировано увеличение площади эпителия почечных канальцев в экспериментальных группах в связи с развитием белковой дистрофии и отеков эпителиоцитов.

Ключевые слова: алмазные наночастицы, технический уголь, токсический эффект.

V. Lavrinenko, applicant, Y. Tchaikovskiy, DMc, L. Degtiarova, DMc
Bogomolets national medical university, Kyiv, Ukraine

BIOLOGICAL EFFECT OF NANODIAMONDS AND SOOT ON STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CONDITIONS OF CHICKEN EMBRYO KIDNEYS

The biological impact of nano-sized materials on kidneys of chicken embryos obtained from incubation of eggs from High-Line white was researched. Suspension of nanodiamonds and soot on bio-friendly dextrane was injected into the yolk sac of embryos on the third day of incubation and the condition of kidney tissues on the 14th and 20th days of incubation was studied. Under the same conditions as experimental groups the eggs from the control group with injection of pure dextrane were incubated. The alteration effect of both researched materials on excretory organs of the embryo was shown. They cause edema, dystrophy and formation of calcificates. The increase of the kidney channels epithelium area due to proteinosis and edema of epitheliocytes was statistically proved for both experimental groups.

Key words: nanodiamonds, soot, toxic effect.

УДК 577.156:577.15.072

И. Вовчук, д-р биол. наук
Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, Одесса

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕИЗМЕНЕННОЙ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ И ЯИЧНИКОВ

Исследован качественный и количественный состав препарата карбоксипептидазы А, полученной из не измененной ткани и тканей доброкачественных и злокачественных опухолей эндометрия и яичника. Показано, что развитие неопластического процесса характеризуется увеличением количества диаминомонокислот в ткани эндометрия и уменьшением количества этих аминокислот в опухолевых тканях яичника. Доля моноаминодикарбоновых аминокислот, вносящих свой вклад в суммарный заряд белковой молекулы уменьшается по мере прогрессии опухолевого процесса яичника и увеличивается в молекуле карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли эндометрия. Установлено, что по мере прогрессии опухолевого процесса в ткани яичника увеличивается содержание гидроксил-содержащих аминокислот, потенциально способных участвовать в катализе. Количество цистеина в ферменте, выделенном из опухолевых тканей как яичника так и эндометрия значительно ниже, чем в ферменте из не измененных тканей этих органов и снижается по мере развития опухолевой прогрессии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксипептидаза А не измененной и опухолевых тканей яичника и эндометрия значительно отличается по качественному и количественному составу аминокислот.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, аминокислотный состав, опухоль, эндометрий, яичник.

Введение. Карбоксипептидаза (КФ 3.4.2.1) А играет важную роль в жизнедеятельности организмов. Установлено, что карбоксипептидаза А участвует в клеточном катаболизме нормальных и аномальных белков, токсинов; в регуляции метаболизма клеток; в ограниченном протеолизе молекул предшественников биологически-активных пептидов и полипептидов; в активации проферментов и других эффекторов белковой природы. Специфическая роль карбоксипептидазы А заключается в деградации специфического мембранно-связанного рецептора I карра В-β, активации фактора некроза (NF-карра В) и активации синтеза макрофа-

гами специфического белка – тканевого фактора некроза опухоли (TNF-α protein) [9]. Изучение регуляции активности карбоксипептидазы А как на молекулярном, так и на тканевом уровнях и сравнительные исследования биохимических свойств карбоксипептидазы А не измененной и опухолевой ткани возможны только в случае получения этих ферментов в очищенном виде.

Несмотря на то, что гомогенный препарат карбоксипептидазы А был получен из некоторых органов и тканей человека: легких [8], поджелудочной железы [13], плаценты [14], почек [10], семенной жидкости [15], культуры клеток карциномы легких [6],