

УДК 616.076.5+575.113+612.68

АНАЛИЗ МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСТОЯНИЯ ГЕНОМА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОЛГОЖИТЕЛЕЙ ПРИКАРПАТЬЯ

Козовый Р.В., Перцович В.М., Ковальчук Л.Е., Багрий М.М.

ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет», Ивано-Франковск, e-mail: ruslan_kozoviy@ukr.net

Исследование цитоденситометрических характеристик лимфоцитов периферической крови в долгожителях (основная группа) и людей зрелого и пожилого возраста (группа сравнения) Ивано-Франковской области установило изменения морфометрических и оптических параметров ядер лимфоцитов периферической крови в зависимости от возраста и пола исследуемых. У всех долгожителей и особенно у мужчин зарегистрировано уменьшение периметра ядер лимфоцитов периферической крови соответственно в 1,15 и 1,16 раза ($p < 0,05$). Площадь ядер этих клеток уменьшалась в 1,18 раза у всех долгожителей (в 1,29 раза – у мужчин и в 1,09 раза – у женщин) по сравнению с таковой у людей зрелого и пожилого возраста ($p < 0,05$).

Ключевые слова: денситометрия, конденсация хроматина, патологические ядра, лимфоциты, долгожители

ANALYSIS MORFODENSITOMETRIC INDICATORS OF THE GENOME OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES LONG-LIVERS PRYKARPATTYA

Kozoviy R.V., Pertsovich V.M., Kovalchuk L.E., Bagriy M.M.

SHEE Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, e-mail: ruslan_kozoviy@ukr.net.

The research of cytodensitometric characteristics of lymphocytes cells of the peripheral blood in long livers (study group) and in old persons (control group) of Ivano-Frankivsk region has been done. Certain changes in morphometric and optical parameters of the lymphocytes cells' nuclei of the peripheral blood, depending on the age and sex of persons being under study were found. Thus, in all long-livers, especially men, the 1,15 and 1,16 ($p < 0,05$) fold reduction of the perimeter of lymphocytes cells' nuclei was registered. The 1,18 ($p < 0,05$) – fold reduction of the area of the cells' nuclei (study group) naturally took place, respectively 1,29 ($p < 0,05$) – fold reduction – for men and 1,09 fold reduction – for women) compared with control group (persons of mature and old age).

Keywords: densitometry, chromatin condensation, abnormal nuclei, lymphocytes, long livers

Процесс старения обусловлен как генетическими, так и факторами окружающей среды, действующими на организм в течение жизни. По одной из теорий в основе старения лежит накопление клеточных нарушений, ослабление механизмов выживания и восстановления клеток и тканей. К молекулярным причинам старения относятся мутации, нарушения процессов репликации и репарации ДНК, гликолиз белков, образование поперечных сшивок между макромолекулами, оксидативный стресс, метилирование ДНК [1]. Морфологическим проявлением последнего, как основного эпигенетического феномена, может быть состояние оптической плотности ядер и диапазон ее изменчивости, обусловленный соотношением конденсации/деконденсации хроматина [8]. Именно с деталями структуры хроматина связаны, большей частью, молекулярные основы тканеспецифической экспрессии генов [10]

Поэтому актуальным в условиях современной антропогенной нагрузки становится изучение не только хромосомных абераций, но и особенностей потенциально обратимых изменений структуры хроматина в соматических клетках. Одним из удобных

объектов для изучения эпигенетических механизмов регуляции функционирования генома являются интерфазные ядра лимфоцитов периферической крови (ЛПК). Большинство исследований экспрессии генов в лимфоцитах основано на их стимуляции цитокинами и сфокусировано на ограниченном числе специфических генов, контролирующих синтез известных молекул. В то же время глобальное изучение ЛПК у представителей разных возрастных групп, в частности долгожителей, часто выпадает с поля зрения исследователей. Лучшее понимание фундаментальных механизмов старения и факторов долголетия имеет первоочередную значимость для реализации полного потенциала здорового старения [1].

Цель работы – установление цитоденситометрических и ультраструктурных особенностей состояния генома лимфоцитов периферической крови у долгожителей Прикарпатья.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили лимфоциты периферической крови долгожителей (основная группа, $n=284$) и людей зрелого возраста (группа сравнения $n=218$). Группу сравнения составили лица в возраст-

те от 36 до 60 лет, в родословных которых не было долгожителей.

Забор материала, изготовление микропрепаратов для морфоденситометрии осуществляли по соответствующим методикам [2]. Исследование цитологических препаратов проводили на оптико-электронном комплексе «Метаскан-2». Хроматин ядер и его изменения изучены с помощью полуавтоматической анализатора изображений на базе программного обеспечения Image Tool for Windows (v 3.0). Преимущество данного метода заключается в возможности комбинированной оценки морфометрических (площадь, периметр), спектрометрических (оптическая и интегральная плотность) данных с анализом микроанатомии отдельных хроматиновых блоков и функции хроматина одновременно. Для определения корреляции спектроморфометрических показателей с эпигенетическими эффектами проанализированы индекс хроматизации (ИХ) – отношение количества клеток, в ядрах которых преобладал еухроматин, к количеству клеток с преобладанием гетерохроматина, а также индекс морфологически-измененных ядер (МИЯ) – по проценту соответствующих клеток. Все вышеописанные показатели изучены в 100 ядродержащих эпителиоцитах каждого обследуемого.

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали, проводили и контрастировали общепринятым методом. Изучение форменных элементов периферической крови проводили на электронном микроскопе ПЭМ-125 К при ускоряющем напряжении 75 кВ с последующим фотографированием при увеличениях от 1200 до 20000 раз.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение цитоденситометрических характеристик лимфоцитов крови является информативным и доступным методом для оценки общего состояния функции и структуры наследственного аппарата организма [4, 5].

Установлены возрастные и половые особенности морфометрических и оптических параметров ядер ЛПК испытуемых (табл.). Так, у всех долгожителей и особенно мужчин зарегистрировано уменьшение периметра ядер лимфоцитов соответственно в 1,15 и 1,16 раза ($p < 0,05$). Закономерно уменьшалась также площадь ядер этих клеток в 1,18 раза у всех долгожителей (в 1,29 раза – у мужчин и в 1,09 раза – у женщин) по сравнению с таковой у людей зрелого и пожилого возраста ($p < 0,05$).

Существенное снижение площади ядер ЛПК в целом при неизменной плотности упаковки хроматина в этих ядрах ограничивает пространство внутри ядра для перемещения и/или взаимодействия отдельных локусов хромосом в этом пространстве. Такие ограничения могут быть серьезным препятствием для нормального функционирования генома и процессов его репарации [9].

Полученные результаты о снижении морфометрических показателей ЛПК у дол-

гожителей подтвердили данные других авторов [1] о том, что с возрастом происходит постепенное обезвоживание клеток, тканей. В тоже время в популяции ЛПК встречались клетки, цитоплазма которых содержала крупные вакуоли, окруженные отдельными митохондриями.

Ядро этих ЛПК было заполнено диффузным хроматином, четко определялось перинуклеарное пространство.

Для более объективной оценки функциональной активности генов на этапе транскрипции был проведен детальный анализ топографии интерфазного хроматина. Мы подтвердили данные других авторов о том, что по плотности его можно разделить на четыре компонента: q1 – неактивный гранулярный гетерохроматин (темный компонент), q2 – более активный гетерохроматин (перигранулярный компонент), q3 и q4 – еухроматин (менее и более светлые компоненты соответственно) [6]. При этом нами установлено незначительное уменьшение количества ядер с фракциями еухроматину q3, q4 у долгожителей по сравнению с таковым у людей зрелого возраста, что соотносится с показателями плотности конденсации хроматина в кариоплазме ядер этих индивидов. Вместе с тем выявлены отличия параметра оптической плотности ядер ЛПК в исследуемой группе от группы сравнения. Самые низкие показатели минимальной оптической плотности, особенно за счет q4 еухроматина, выявлены у женщин долгожителей, что коррелировало с диапазоном изменчивости оптической плотности ($r = -0,951$, $p < 0,05$). У мужчин долгожителей минимальная оптическая плотность ядер ЛПК незначительно превалировала с таковой в группе сравнения. Показатель максимальной оптической плотности ядер ЛПК у долгожителей преобладал над таковой у людей из группы сравнения в 1,13 раза (у женщин – в 1,14 и у мужчин – в 1,11 раза).

Количественный анализ диапазона изменчивости оптической плотности, то есть нормы реакции степени конденсации хроматина лимфоцитов у долгожителей, показал широкие пределы изменчивости и функциональной неоднородности клеток по сравнению с таковой у людей с зрелого и пожилого возраста. У женщин с основной группы диапазон изменчивости оптической плотности хроматина был больше, чем у мужчин и коррелировал с результатами изучения показателя ИХ ($r = 0,981$, $p < 0,05$). Полученный факт может свидетельствовать о большем диапазоне изменчивости популяции лимфоцитов у лиц женского пола. Кроме того, показатель ИХ является одним из важнейших маркеров экспрессивности

генома и косвенно коррелирует с количеством дерепрессованной ДНК [3]. Изучением особенностей перестройки интерфазного хроматина ЛПК у долгожителей выявлено преимущество ядер с деконденсованным хроматином в противовес такому в группе сравнения в 1,09 раза (см. табл.).

Различные типы клеток человеческого организма содержат одинаковое количество ДНК, хотя экспрессия генов у них разная [4]. Именно изменения хроматина и структуры ядер клеток могут указывать на функциональные нарушения генотипа, обусловленные экзо- и эндогенными факторами, состоянием адаптивных возможностей организма.

Важным критерием оценки наследственного аппарата может быть состояние структуры ядер. В случае патологических изменений кариолемы или кариоплазмы изменяется топография хромосом, вероятность присоединения ДНК для деспирализации и последующей транскрипции [7]. Нами получены данные о более частом нарушении нормальной структуры ядер у лиц из группы сравнения чем у долгожителей, соответственно (3,71±0,35)

и (4,62±0,41)%. Установлена зависимость количества МИЯ у всех обследованных лиц от пола. Так, у мужчин этот показатель был больше по сравнению с таковым у женщин в 1,15 раза в основной группе соответственно (4,23±0,32) и (3,68±0,36)% и в 1,35 раза в группе сравнения (5,31±0,44) и (3,93±0,38)%. На препаратах исследуемых идентифицировались большие ядра с диффузным хроматином, вакуолизированные, иногда бобовидные или лопатовидные ядра.

Часто ядерная мембрана ЛПК образовывала инвагинации, имевшие вид каналов. Характерным цитологическим признаком влияния негативных экзогенных факторов было образование сегментовидных ядер ЛПК, появление микроядер [5]. У некоторых людей патологические изменения ядер были настолько глубокими, что приводили к разрушению кариолеммы. Учитывая механизм образования клеток с атипичными ядрами, их, вероятно, можно отнести к показателям цитогенетического действия экзо- и эндогенных факторов.

Таблица

Морфо-денситометрические показатели ядер лимфоцитов периферической крови у долгожителей и группы сравнения, M±m

Параметр	Долгожители			Группа сравнения		
	общегрупповой	мужчины	женщины	общегрупповой	мужчины	женщины
Периметр ядра, мкм	70,54±1,88*	68,63±1,55*	72,45±2,27	80,83±1,93	79,45±2,21	82,21±1,74
Площадь ядра, мкм ²	259,81±23,53*	240,26±24,74*	279,36±22,01	306,91±25,22	310,71±17,21	303,11±31,61
Минимальная оптическая плотность	67,0±3,37	75,7±1,56	58,3±4,36*	71,92±4,87	74,64±7,73	69,20±3,53
Максимальная оптическая плотность	125,5±28,67	131,0±22,47	120,0±37,89	111,45±17,51	114,96±8,91	107,94±24,23
Диапазон изменчивости оптической плотности	58,5	55,3	61,7	39,53	40,32	38,74
Отношение ядер с преобладанием евхроматину к ядрам с преобладанием гетерохроматина (ИХ), ум.од.	0,75±0,5*	0,74±0,2*	0,77±0,4*	0,82±0,3	0,82±0,2	0,82±0,1

Примечание. * – достоверность различий с показателями группы сравнения (p<0,05).

Выводы

1. Установлено уменьшение периметра и площади ядер ЛПК у всех долгожителей и особенно мужчин по сравнению с лицами зрелого и пожилого возраста.

2. Доказано увеличение диапазона изменчивости оптической плотности ЛПК у долгожителей, особенно у женщин, более выраженную функциональную неоднородность клеток по сравнению с таковыми у людей с зрелого и пожилого возраста. У долгожителей выявлено преобладание ядер с деконденсованным хроматином и нарушения нормальной структуры ядер по сравнению с таковыми в группе сравнения.

Список литературы

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.

2. Ганина К.П. Цитогенетическая диагностика в онкоморфологии / Ганина К.П. – К. – Наукова думка. – 1980. – 176 с.

3. Гвоздев В.А. Гетерохроматин и его функциональные характеристики / В.А. Гвоздев, Л.А. Усакин, Г.Л. Коган // Медицинская генетика. – 2003. – № 7. – С. 290 – 296.

4. Ковальчук Л.С. Встановлення динаміки мутагенного навантаження на організм на основі обліку змін показників функціонального стану геному дітей різних регіонів ІваноФранківської області / Л.С.Ковальчук, Р.В. Козовий, З.Р. Кочерга, Н.В. Чернюк // Вісник морфології. – 2004. – Т.2, № 2. – С. 430–432.

5. Козовий Р.В. Цитогенетичні показники функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові у довгожителів Івано-Франківської області / Р.В. Козовий, Р.І. Багриновський // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – № 2. – с.78-83.

6. Тепляков А.И. Топография интерфазного хроматина нейтрофильных гранулоцитов при атеросклерозе: еще одно подтверждение экспрессии генов для завершения ими функциональной программы / А.И. Тепляков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. – № 2. – С. 40-43.

7. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. – М.: МКЦ «Академкнига», 2005. – 495с.

8. Gesser S.M. Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei / S.M. Gesser // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 1412-1416.

9. Hendrich B. Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification / B. Hendrich, W. Bickmore // Hum. Mol. Genet. – 2001. – Vol.10. – P.2233-2242.

10. Rasmussen T. Embryonic stem cell differentiation: a chromatin perspective // Reprod. Biol. Endocrinol. – 2003. – Vol.1 (1). – P. 100.