

ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ: ИНДУКТОР ИЛИ МОДИФИКАТОР МУТАЦИОННЫХ СПЕКТРОВ?

Т. Т. Глазко

Институт агроэкологии и биотехнологии Украинской академии аграрных наук, Киев

Выполнен сравнительный анализ частот встречаемости цитогенетических аномалий в клетках костного мозга лабораторных линий мышей, трех видов полевок, а также в клетках периферической крови крупного рогатого скота, воспроизводившихся в условиях хронического действия низкодозового ионизирующего излучения в зоне отчуждения ЧАЭС. Среди исследованных животных не обнаружено носителей конститутивных цитогенетических аномалий. Под влиянием хронического низкодозового излучения наблюдается увеличение только тех цитогенетических аномалий, изменчивость которых вносила наибольший вклад в линейные (у линий мышей) и видовые (у полевок) особенности спонтанных мутационных спектров. У “старых” линейных мышей в черномыльском спецвиарии частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках костного мозга ниже, чем у “старых” мышей тех же линий в “чистой” зоне, что совпадает с увеличением темпов клеточного деления (обновлением клеточных популяций) у черномыльских животных. Полученные данные свидетельствуют о том, что хроническое низкодозовое ионизирующее излучение не индуцирует новых аномалий, а только усиливает проявление исходно нестабильных цитогенетических характеристик.

Развитие методов аналитической химии показало наличие большого количества разнообразных повреждений ДНК, возникающих под влиянием эндогенных причин [1]. Так, например, апуриновые/апиримидиновые (АП) сайты в ДНК могут возникать в результате спонтанного гидролиза или в результате эксцизионной репарации, катализируемой гликозилазой. Накамура и Свенберг [2]. подсчитали количество АП сайтов в ДНК тканей. Они нашли, что их количество достигает 50000 - 200000 АП сайтов на геном в большинстве тканей человека и грызунов. Показано, что их количество, так же как и других модификаций нуклеотидных последовательностей, резко возрастает при активации окислительных процессов в клетках [1]. В то же время, при прямых подсчетах мутаций в структурных генах оказывается, что на уровне нуклеотидных последовательностей частота спонтанных мутационных событий (нуклеотидные замены) очень высока. Так, в частности, в клетках человека частота спонтанных мутаций оценивается в настоящее время как $5 \cdot 10^{-11}$ на одно основание на одно клеточное деление [3]. При расчетах авторы указанной работы рассматривали нуклеотидные замещения, вставки-делеции нуклеотидов и более комплексные изменения нуклеотидных последовательностей только в структурных генах, которые могут оставаться нерепарированными.

Предполагая, что в среднем в гаплоидном геноме одной клетки находится около 100000 апурин/апиримидиновых сайтов [2], получается, что один такой сайт приходится на $3 \cdot 10^4$ нуклеотидов в среднем по геному, или $3 \cdot 10^3$ на нуклеотидные последовательности, кодирующие структурные гены, если считать, что они составляют примерно 10 % от всего генома. Видно, что это значение существенно больше, чем частота спонтанных мутаций по структурным генам ($5 \cdot 10^{-11}$). То есть такие потенциальные генетические дефекты, как АП сайты, реализуются в мутации по структурным генам примерно в 10^7 (в 10 миллионов раз) реже, чем возникают.

У человека приблизительно 10^7 клеток делится каждую секунду [1]. С учетом частоты мутаций на один нуклеотид на одну репликацию по структурным генам ($5 \cdot 10^{-11}$) получается, что примерно 1 нуклеотидная замена возникает на 1000 клеток, т.е. 0,1 % из делящихся клеток приобретает нерепарируемый нуклеотидный дефект только по структурным генам. Из этих подсчетов следует, что у человека каждую секунду может появляться примерно 10 тыс. (10^4) таких мутантных клеток.

Таким образом, очевидно, что при таком гигантском количестве потенциальных генетических дефектов и клеток, в которых эти дефекты реализуются в нерепарируемые мутационные события по структурным генам, проявления этих мутаций начинают зависеть от тех факторов, которые их ограничивают.

Наглядным свидетельством сложности репарационных процессов у живых организмов может служить и сравнения полулетальных поглощаемых доз ионизирующего излучения. Так, в среднем для класса млекопитающих типичная полулетальная доза исчисляется 4 - 6 Гр, для симбионта человека *Escherichia coli* - 30 Гр, для микроорганизма *Deinococcus radiodurans* - 3000 Гр [4]. Имеются данные о том, что частота спонтанных мутаций у микробов на геном на репликацию по структурным генам несколько ниже, чем у высших эукариот [3]. Давно известны тканеспецифические и онтогенетические особенности возникновения различных типов мутаций у млекопитающих, в частности полиплоидизация гепатоцитов или преимущественная анеуплоидия у эмбриональных стволовых клеточных линий по сравнению с соматическими клетками [5]. Частота встречаемости классических “лучевых” цитогенетических маркеров, таких как дицентрики, увеличивается не только у млекопитающих, получивших дозу ионизирующего излучения, но и у трансгенных животных.

В наших экспериментальных исследованиях на трех разных лабораторных линиях мышей было обнаружено, что каждая из них характеризуется своим спонтанным мутационным спектром в клетках костного мозга и только некоторые его характеристики меняются в связи возрастом и сезоном исследования. Так, для линии мышей C57BL/6 типично нарастание анеуплоидии (хромосомных потерь) с возрастом и при переходе к летнему сезону по сравнению с зимним. Для линии CC57W/Mv изменения в связи с возрастом и сезоном преимущественно наблюдались по внутривнутрихромосомным дефектам (хромосомным абберациям); для линии BALB/c - по доле полиплоидных клеток. Причем в условиях повышенного уровня ионизирующего излучения примерно в 100 раз (около 0,4 Гр в год) в спецвиварии около ЧАЭС наблюдалось повышение частот встречаемости у каждой линии только тех аномалий, спонтанная нестабильность которых обнаруживалась в контрольных условиях. Например, у линии C57BL/6 увеличивалась частота анеуплоидных клеток, у линии CC57W/Mv – метафаз с хромосомными абберациями, т.е., в данном случае повышение ионизирующего излучения не приводило к появлению новых характеристик в мутационных спектрах у мышей, а только усиливало проявление спонтанной нестабильности по отдельным, линейноспецифичным характеристикам таких спектров.

Следует отметить, что у мышей отмечается отчетливая связь мутационных эффектов повышенного уровня ионизирующего излучения в зависимости от возраста мышей. Так, “старые” мыши в контрольных условиях отличались от “юных” у мышей линии CC57W/Mv более высокой частотой встречаемости различных цитогенетических аномалий, в частности одноклеточных лейкоцитов с микроядрами. В то же время у “старых” мышей экспериментальной (чернобыльской) группы, подвергавшихся в течение жизни действию повышенного уровня ионизирующего излучения, частота таких аномалий оказалась меньше не только по отношению к своему возрастному контролю, но и по сравнению с “юными” чернобыльскими мышами. Эти различия сопровождаются статистически достоверным увеличением делящихся клеток в костном мозгу “старых” чернобыльских мышей по сравнению с их “старым” контролем; т.е. в течение жизни в условиях повышенного уровня ионизирующего излучения у мышей, в отличие от контрольных условий, не происходит уменьшения темпов клеточного деления в костном мозгу, что, по-видимому, сопровождается ускорением элиминации клеток с генетическими дефектами.

Интересно подчеркнуть, что сходные данные были получены другими авторами, показавшими, что стимуляция клеточного деления при высоких дозах ионизирующего облучения приводит к ускорению элиминации клеток с генетическими дефектами [6].

Выполнены исследования мутационных спектров и у представителей трех видов полевок (*Microtus arvalis*, *Microtus oeconomus* и *Clethrionomys glareolus*), отловленных в зоне

отчуждения ЧАЭС в местообитаниях с повышенным уровнем радионуклидного загрязнения. В наименее загрязненных радионуклидами местообитаниях (<5 Ки/км²) у самого эволюционно “молодого” вида из исследованных обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) обнаружена высокая частота встречаемости анеуплоидных клеток, у рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) – метафаз с межхромосомными слияниями по типу робертсоновских транслокаций. По сравнению с этими видами, клетки самого эволюционно “старого” вида полевки экономки (*Microtus oeconomus*), характеризовались относительно повышенной стабильностью хромосомного аппарата по исследованным характеристикам мутационных спектров. Оказалось, что у полевок, отловленных в местообитаниях с повышенным уровнем радионуклидного загрязнения (с. Янов – около 200 Ки/км²; с. Чистоголовка – около 500 Ки/км²; “Рыжий лес” – около 1000 Ки/км²), в клетках костного мозга наблюдается накопление именно тех цитогенетических аномалий, повышенная изменчивость которых была видоспецифична для мутационных спектров полевок и в относительно чистых местообитаниях: для рыжей полевки - метафаз с робертсоновскими межхромосомными слияниями, для обыкновенной полевки - анеуплоидов. Наименьшей изменчивостью в местах с повышенным радионуклидным загрязнением, соответственно, отличались мутационные спектры клеток полевки экономки. То есть, как и в случае линейных мышей, повышенное ионизирующее облучение не приводило к появлению качественно новых характеристик мутационных спектров, а только усиливало проявление тех видоспецифичных характеристик таких спектров, повышенная нестабильность которых наблюдалась у животных, отловленных в относительно “чистых” зонах.

При анализе вкладов индивидуальных хромосом в цитогенетические аномалии у представителей различных видов мышевидных грызунов наблюдаются выраженные индивидуальные и видовые отличия. Так, например, для мышей линии C57BL/6 асинхронность по разделению центромерных районов наблюдалась преимущественно по хромосоме 19, а у мышей линии BALB/c – по хромосоме 16. У полевок-экономок обнаруживалась тенденция к более частому вовлечению в анеуплоидию и асинхронное расщепление центромерных районов субacroцентрической и acroцентрической хромосом 10 и 14, что, возможно, связано с особенностями их морфологии, поскольку большая часть кариотипа полевки-экономки представлена мета- и субметацентрическими хромосомами. У обыкновенных полевок чаще всего наблюдалась анеуплоидия по хромосомам промежуточного размера и повышенная частота встречаемости хроматидных разрывов по центромерным районам. У рыжих полевок, большинство хромосом которых представлены acroцентриками, более часто в асинхронность расщепления центромерных районов хромосом вовлекались мелкие метацентрические аутосомы.

Полученные данные позволяют предполагать, что повышение уровня ионизирующего излучения (в пределах исследованных нами) у лабораторных линий мышей и у полевок только увеличивают частоту встречаемости цитогенетических аномалий, по которым обнаруживаются линейно- (для мышей) и видоспецифичная повышенная изменчивость в контрольных условиях. Сложность анализа таких мутационных спектров увеличивается еще и тем, что у исследованных животных наблюдается выраженное предпочтительное вовлечение в определенные типы цитогенетических аномалий индивидуальных хромосом.

Можно ожидать, учитывая общий высокий уровень спонтанных повреждений ДНК и реализованных нерепарируемых мутаций в соматических клетках (которые обсуждались выше), что такие специфические различия в характеристиках спонтанных мутационных спектров обусловлены генетически детерминированными дефектами соответствующих репарационных систем. И если у этого организма в относительно “чистых” зонах имеется определенный дефицит систем, контролирующих расхождение хромосом в митозе по дочерним клеткам, как, например, у мышей линии C57BL/6 или обыкновенных полевок, то именно такой тип аномалий и будет увеличиваться, в первую очередь, под влиянием генотоксических воздействий.

Таким образом, выполненные исследования свидетельствуют в пользу предположения о том, что при увеличении уровня ионизирующего излучения наблюдается не прямая индукция генетических повреждений, а ослабление механизмов их репарации или элиминации несущих их клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Marnett L.J., Plastaras J.P.* Endogenous DNA damage and mutation // Trends in Genetics. -2001. - Vol. 17, No. 4. - P. 214 - 221.
2. *Nakamura J., Swenberg J.A.* Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues // Cancer Res. - 1999. - Vol. 59. - P. 2522 - 2526.
3. *Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F.* Rates of spontaneous mutation // Genetics. – 1998. - Vol. 148. - P. 1667 - 1686.
4. *Battista J.R., Earl A.M., Park M-J.* Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? // Trends in Microbiology. - 1999. - Vol. 7, No. 9. - P. 362 - 365.
5. *Cervantes R.B., Stringer J.R., Shao C. et. al.* Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type // PNAS. - 2002. - Vol. 99, No. 6. - P. 3586 – 3590.
6. *Rothkamm K., Lobrich M.* Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses // PNAS. - 2003. - Vol. 100, No. 9. - P. 5057 – 5062.

Поступила в редакцию 06.12.04,
после доработки - 07.02.05.

29 ІОНІЗУЮЧЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ: ІНДУКТОР ЧИ МОДИФІКАТОР МУТАЦІЙНИХ СПЕКТРІВ?**Т. Т. Глазко**

Виконано порівняльний аналіз частот зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах кісткового мозку лабораторних ліній мишей, трьох видів полівок, а також у клітинах периферичної крові великої рогатої худоби, що відтворюється в умовах хронічної дії низькодозового іонізуючого опромінення в зоні відчуження ЧАЕС. Серед досліджених тварин не виявлено носіїв конститутивних цитогенетичних аномалій. Під впливом хронічного низькодозового опромінення спостерігається збільшення тільки тих цитогенетичних аномалій, мінливість яких давала найбільший внесок у лінійні (у ліній мишей) та видові (у полівок) особливості спонтанних мутаційних спектрів. У “старих” лінійних мишей у чорнобильському спецвіварії частоти зустрічальності цитогенетичних аномалій у клітинах кісткового мозку нижчі, ніж у “старих” мишей тих же ліній у “чистій” зоні, що збігається зі збільшенням темпів клітинного поділу (оновлення клітинних популяцій) у чорнобильських тварин. Одержані дані свідчать про те, що хронічне низькодозове іонізуюче опромінення не індукує нові аномалії, проте тільки посилює прояв вихідно нестабільних цитогенетичних характеристик.

29 IONIZING IRRADIATION: INDUCTOR OF MODIFICATOR OF MUTATION SPECTRA?**T. T. Glazko**

The comparative analysis of cytogenetic anomaly frequencies in bone marrow cells of mice laboratory lines and three vole's species, and also in cells of peripheral blood of cattle, which were reproduced in conditions of a chronic influence of low doze of ionizing irradiation in alienation zone of Chernobyl was carried out. Among investigated animals it was not revealed of carriers of any constitutive cytogenetic anomalies. Under chronic influence of low doze of radiation the increase only those cytogenetic anomalies was observed, which variability introduced the greatest contribution in linear (at lines of mice) and species (at voles) specificity of spontaneous mutation spectra. In “old” linear mice in Chernobyl's vivarium the frequency of cytogenetic anomalies in bone marrow cells was lower, than in “old” mice of the same lines in a “pure” zone, that coincided with the increase of rates of cell division (up-dating of cell populations) in Chernobyl's animals. The obtained data testify that the chronic low doze ionizing irradiation did not induce the new cytogenetic anomalies, but only strengthened a realization of initially unstable cytogenetic defects.