

СОСТОЯНИЕ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

С. Б. Мельнов, П. Г. Рытик, Н. Г. Кручинский, В. А. Ковалев, Л. А. Паламар, О. Ф. Сенюк

*РНПЦ радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь
Институт проблем безопасности АЭС НАН Украины, Чернобыль*

Приведены результаты анализа состояния генома (количества однонитевых разрывов ДНК) лиц, подвергающихся воздействию комплексного «чернобыльского фактора» в отдаленные сроки после аварии на ЧАЭС. Полученные данные позволили выявить у хронически облучаемых лиц наличие повышенного уровня однонитевых разрывов ДНК, которые имеют преимущественно адаптивный характер и предположительно могут быть связаны с нестабильностью генома. При этом на организменном уровне нарастание мутационного давления и усиление нестабильности генетического аппарата клеток сопряжено с изменением ряда биологических характеристик, в частности с индивидуальной реакцией соматических клеток на дополнительные мутагенные воздействия. Указанные изменения могут свидетельствовать о существовании потенциального риска отдаленных генетических последствий низкодозовых радиационных воздействий.

Введение

Авария на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) в 1986 г. сопровождалась огромным выбросом в атмосферу продуктов ядерного деления урана и плутония – сложной смесью более 4200 изотопов 36 элементов периодической системы, β -излучателей с сопутствующим выбросом γ -квантов. В ее результате возник гигантский высокоактивный открытый источник ионизирующих излучений – объект «Укрытие». Большая часть выброса распределилась по территории Украины, Беларуси и России, что существенно повлияло на общую экологическую ситуацию в пострадавших регионах. Реальные ответы на вопросы о влиянии последствий новой, постчернобыльской, экологической ситуации в отношении состояния здоровья персонала объекта «Укрытие» и пострадавшего населения могут быть получены только в ходе проведения широкомасштабных исследований.

Цель работы - изучение особенностей молекулярно-генетического статуса ликвидаторов 1986 - 1987 гг., подвергшихся воздействию комплекса неблагоприятных факторов, обусловленных Чернобыльской катастрофой и персонала, обслуживающего современный объект «Укрытие».

Радиационно-индуцированная генетическая нестабильность

В последние годы пристальное внимание специалистов, изучающих эффекты радиационных воздействий, привлекает феномен геномной нестабильности. Его расценивают как один из наиболее опасных эффектов влияния ионизирующих излучений (ИИ) на биоту. Принято считать, что основной мишенью для действия ИИ является ДНК, степень повреждения которой является критическим моментом для гибели клетки [1]. При этом повреждение мембраны менее эффективно [2, 3], и ведущие позиции в формировании отдаленных эффектов принадлежат повреждениям ДНК [4]. При прохождении ИИ через ткани млекопитающих высвобождаясь энергия вызывает как прямое (за счет образовавшихся свободных электронов), так и косвенное (прежде всего через продукты радиолитической воды) повреждение ДНК с формированием различных разрывов ее нитей. Большей частью это однонитевые разрывы ДНК (ОНР), которые, как правило, могут легко репарироваться при использовании в качестве матрицы второй нити ДНК с интактной структурой. В некоторых случаях, однако, два разрыва могут располагаться на близком расстоянии друг от друга и вовлекать обе нити ДНК с формированием двунитевых разрывов ДНК (ДНР). Именно такой эффект ИИ ответственен за гибель клеток, мутагенез, злокачественную трансформацию и образование опухолей [5, 6].

В нормальных условиях ДНК клеток также постоянно подвержена “спонтанной” тепловой и гидролитической деградаци, окислению и неферментативному метилированию. Эти нарушения в клетке репарируются достаточно эффективно. Основными гидролитическими повреждениями являются депуринизация и депиримидизация, а также “спонтанное” дезаминирование оснований [7]. За одну минуту в эукариотической клетке образуется около 130 (187200 за сутки) повреждений ДНК [8, 9], среди которых доминируют ОНР. Вклад этого типа повреждений в нестабильность генома после облучения в малых дозах не является существенным. Считается, что резкое возрастание ОНР прямо коррелирует с увеличением количества ДНР и соотношение количества ОНР к ДНР может соответствовать значениям 10 - 50 в зависимости от условий облучения клеток и типа излучения.

Несмотря на то, что ДНР имеют очень короткий период существования и, как правило, быстро репарируются, они могут вызывать формирование хромосомных аббераций [10], которые могут оказаться летальными при вхождении клеток в стадию митоза. С другой стороны, ДНР могут восстанавливаться без симметричных транслокаций, способных обеспечить запуск каскада явлений активации - деактивации генов, лежащих в основе радиогенного канцерогенеза. Полагают [11], что частота ДНР коррелирует с клеточной радиационной чувствительностью. Образование локальных множественных повреждений на участках ДНК играет доминирующую роль в радиационной гибели, возникновении хромосомных, генных мутаций и неопластической трансформации клеток [12, 13] Неправильная репарация разрывов ДНК сопряжена также с возникновением генетической нестабильности, что ведет к формированию репликационно-ошибочного фенотипа и может быть сопряжена с малигнизацией [14].

Таким образом, радиогенные разрывы ДНК являются первым шагом в формировании геномной нестабильности и хромосомных аббераций. Летальные их варианты эффективно элиминируются на протяжении нескольких клеточных делений, а нелетальные могут сохраняться и запускать каскад генетических явлений, лежащих в основе онкогенеза. При этом суммарный результат определяется двумя параллельно протекающими процессами - пострадиационное формирование ОНР и ДНР и их восстановление за счет активности репарационных систем клетки [15].

Методика определения ОНР в ДНК

Определение частоты разрывов ДНК проводили по оригинальной методике (Fast Micromethod I DNA single-strand break assay and Fast Micromethod) раскручивания и мечения ДНК флюоресцентным красителем пикогрином (Leiden, Netherland) [16], взаимодействующим только с двойной закрученной спиралью ДНК и позволяющей учитывать количество таких спиралей ДНК. Объем образца нерасплетенной ДНК в нулевое время служит контролем и записывается как 100 %-ное содержание двойных спиралей. Величину флюоресценции оценивали на протяжении одного часа при 480 нм экситации и 520 нм эмиссии с помощью специального ридера (Fluoroskan Tecan, Austria). Результаты представляли в виде коэффициента раскручивания спирали (КРС), который рассчитывали на 20-й минуте экспозиции двойной спирали ДНК (дсДНК) с расплетающим буфером по формуле

$$KPC = \log (\% \text{ дсДНК в пробе} / \% \text{ дс ДНК в контроле}).$$

Отрицательные значения КРС свидетельствуют об увеличении частоты ОНР ДНК.

Седиментацию лимфоцитов из периферической венозной крови осуществляли при помощи центрифугирования (при 400 g на протяжении 25 мин) в градиенте плотности фикол-верографина (1,077 г/л). Для обработки полученных результатов использовали методы вариационной статистики [17], за достоверные принимали отличия при $P < 0,05$.

Частота ОНР ДНК у участников ликвидации аварии на ЧАЭС

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что состояние генома, как правило, определяется локальным состоянием окружающей среды, особенностями генотипа местной популяции и многими другими факторами. Особое значение приобретает исследование стабильности генома у граждан Украины, Беларуси и России после Чернобыльской аварии в связи с существенным ухудшением экологической ситуации и усилением мутационного давления.

Нами предпринята попытка оценить уровень суммарной частоты ОНР ядерной ДНК клеток лимфоцитов периферической крови у разных контингентов облучаемых лиц, в частности у участников ликвидации последствий аварии (ЛПА) на ЧАЭС 1986 - 1987 гг., персонала современного объекта «Укрытие». Данные приведены в табл. 1.

Таблица 1. Уровни ОНР ДНК у ЛПА на ЧАЭС 1986 - 1987 гг. и персонала объекта «Укрытие», обследованных в 2002 - 2004 гг.

| Группы обследованных (n) | Коэффициент расщепления двойной спирали ДНК, КРС |
|---|--|
| Участники ЛПА на ЧАЭС (n = 32) | 0,12974 ± 0,012* |
| Персонал объекта «Укрытие» | |
| Группа 1. Доза 0,05 - 0,10 Зв (n = 19) | 0,04341 ± 0.0024 |
| Группа 2. Доза > 0,50 Зв (n = 24) | 0,15279 ± 0.0062* |
| «Радиоинтактные» киевляне - доноры крови, станция переливания крови г. Киева (n = 17) | 0,036013 ± 0,006 |

* $p < 0,05$.

Полученные значения коэффициента расщепления двойной спирали ДНК свидетельствуют о больших колебаниях этого показателя у различных категорий обследованных лиц. При этом хорошо прослеживается зависимость нарастания количества ОНР ДНК в зависимости от интенсивности воздействия радиационного фактора. Это касается групп с известной накопленной дозой общего внешнего облучения. Доноры крови станции переливания крови г. Киева (СПК, рассматриваемые в качестве отрицательного контроля по фактору облучения), демонстрируют самые низкие уровни КРС, которые достоверно отличаются от аналогичного показателя как персонала объекта «Укрытие» с высокой общей дозой внешнего облучения, так и участников ЛПА на ЧАЭС ($p < 0,05$). У персонала объекта «Укрытие», представленного в виде двух групп с различной учтенной величиной накопленной дозы внешнего облучения – низкой (от 0,05 до 0,10 Зв) и относительно высокой (более 0,50 Зв), наблюдается достоверная разница ($p < 0,05$) с разницей в 3,5 раза в средних значениях КРС ДНК. Также высоки достоверно отличающиеся ($p < 0,05$) количества ОНР в ядерной ДНК лимфоцитов регистрируются у граждан Беларуси – участников ЛПА на ЧАЭС. При этом имеет место существенное варьирование параметра на индивидуальном уровне.

Дополнительную индукцию ОНР в ДНК вызывали следующими способами:

1) экспозицией *in vitro* на протяжении 10 мин в интенсивных γ -полях (МЭД ~ 300 Р/ч) с достижением внешней дозы облучения ~ 50 Р;

2) прогреванием лейкоцитов при 42 °С на протяжении 15 мин *in vitro* (в термостате) с целью моделирования перегрева, являющегося часто традиционным компонентом микроклимата во внутренних помещениях объекта «Укрытия» и способного выступать в роли дополнительного фактора, способствующего нарушению целостности ДНК;

3) экспозицией *in vivo* на протяжении пребывания персонала во внутренних помещениях объекта «Укрытие» (сравнение ОНР ДНК в лимфоцитах, полученных до выхода на сменное задание и сразу после его завершения).

Полученные данные представлены в табл. 2 и 3. Анализ данных, представленных в табл. 2, позволяет отметить тенденцию к дальнейшему увеличению у персонала КРС ДНК

(на 18 % от исходного уровня) после выхода со сменного задания. При этом накопленная доза за смену колебалась в пределах от 0,0027 до 0,0100 Зв.

Таблица 2. Влияние разных режимов облучения на значения КРС в ядерной ДНК лимфоцитов персонала объекта «Укрытие» (n = 11)

| Значения КРС ДНК при разных условиях облучения | | |
|--|--|---|
| Исходный уровень | После облучения in vivo, полученного за рабочую смену (0,0027 – 0,0100 Зв) | После облучения in vitro 60 Р (экспозиция 10 мин при МЭД 300 Р/ч) |
| 0,01177 ± 0,00142 | 0,1372 ± 0,00118 | 0,1578 ± 0,0165 |

Несмотря на то, что параллельное острое γ -облучение образцов цельной крови на протяжении 10 мин при мощности экспозиционной дозы (МЭД) ~ 300 Р/ч, как и следовало ожидать, приводило к дальнейшему накоплению ОНР в ядерной ДНК лимфоцитов облученной крови, выявленные изменения авторы не склонны расценивать как результат действия только радиационного фактора как такового. Негативное влияние радиационного фактора этого объекта на персонал может быть обусловлено способностью малых доз ионизирующих излучений потенцировать действие других “внутриобъектных” производственных вредностей. Интеграл качества производственных условий этого объекта создается как «экстраординарным» состоянием его внутренних помещений (сложная геометрия большинства рабочих мест, загроможденность и сложность доступов, наличие факторов высоты и “замкнутого пространства”, инфразвуковые воздействия), их микроклиматом (высокая влажность и дискомфортный температурный режим, далеко не отвечающие требованиям техники безопасности; недостаточное и искусственное освещение), особым составом воздушной среды (токсичные аэрозоли, озон и аэроионы, образующиеся в повышенных концентрациях в местах скопления ТСМ и способные разрушать сурфактан легких), так и спецодеждой вместе со средствами индивидуальной защиты (комбинезоны, куртки, перчатки, бахили, капюшоны изготовлены из пластика и поэтому создают угрозу перегрева с потерей сознания, которое может наступить раньше, чем осознается сам факт перегрева).

Таблица 3. Влияние дополнительного прогревания in vitro на количество ОНР в ДНК лимфоцитов персонала объекта «Укрытие»

| Значения КРС ДНК при разных условиях облучения с последующей гипертермией in vitro (15 мин, при 42 °С) | | |
|--|-------------------|--|
| Исходный уровень | После гипертермии | Гипертермия после облучения in vitro, 60 Р |
| 0,0823 ± 0,0092 | 0,0968 ± 0,0101 | 0,1230 ± 0,0118 |

Данные, приведенные в табл. 3 на модели учета ОНР в ядерной лимфоцитарной ДНК сотрудников объекта «Укрытие», подтверждают высказанное предположение о возможности негативного влияния перегрева на организм человека. Как следует из полученных результатов, дополнительное прогревание клеток, выделенных из периферической крови хронически облучаемых в объекте «Укрытие» людей, ассоциируется с дальнейшим прогрессивным накоплением ОНР в ДНК.

Совокупность перечисленных факторов играет решающую роль в механизмах дезадаптации центральной нервной системы и возникновения психо-неврологических нарушений у лиц, пострадавших при аварии на ЧАЭС [18].

По результатам ежегодных медосмотров выявляется тенденция к стабильному росту заболеваний. При этом заболеваемость персонала объекта «Укрытие» выше, чем заболеваемость персонала ОП ЧАЭС на 21,1 %, а болезни органов дыхания представлены на объекте «Укрытие» на 11,3 %, сердечно-сосудистые на 5,5 % больше, чем на ОП ЧАЭС. При сравнении заболеваемости персонала объекта «Укрытие» с заболеваемостью населения Киева

выявляется высокий риск психических расстройств (в основном психоневрозов), болезней желудка и 12-перстной кишки, болезней нервной системы, ишемической болезни сердца, заболеваний глаз [19]. У 28 % обследованных работников зарегистрировано функциональное напряжение с неудовлетворительной адаптацией и со срывом адаптации. Показано, что с увеличением стажа работы в объекте «Укрытие» адаптационные резервы организма снижаются и достигают критических значений через 3 – 5 лет работы. У каждого из обследуемых работников объекта «Укрытие» имеется пять и более болезней, требующих постоянного медицинского контроля и своевременных реабилитационных мероприятий.

Выводы

Хроническое облучение людей в диапазоне малых доз негативно влияет на структуру генетического материала. При этом перегрев, что часто является традиционным компонентом микроклимата во внутренних помещениях объекта «Укрытия» при выполнении регламентных и других работ, может выступать как дополнительный генотоксический фактор

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nunez MI, McMillan TJ, Valenzuela MT et al.* Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells // *Radiother Oncol.* 1996 May;39(2): 155 -165.
2. *Haimovitz-Friedman A., Balaban N., McLoughlin M. et al.* Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis // *Cancer Res.* 1994 May 15; 54(10): 2591 -2597.
3. *Iarova M.S., Pribush A.G., Fedorova L.I. et al.* Changes in cellular radiosensitivity by modifying the cytoplasmic membranes // *Radiobiologia.* 1992 Jul-Aug; 32(4): 560 - 565.
4. *Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of the Atomic Radiation, 2000.*
5. *Radford IR, Murphy TK.* Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage // *Int J Radiat Biol.* 1994 Feb; 65(2): 229 - 239.
6. *Li X, Patel R, Melamed MR, Darzynkiewicz Z.* The cell cycle effects and induction of apoptosis by 5-bromouridine in cultures of human leukaemic MOLT-4 and HL-60 cell lines and mitogen-stimulated normal lymphocytes. // *Cell Prolif.* 1994 Jun; 27(6): 307 - 309.
7. *Lindahl T.* // *Nature (L.).* - 1993. - Vol. 362. - P. 376 – 379.
8. *Спутковский Д.М.* // *Радиационная биология. Радиоэкология.* - 1999. - Т. 39, № 1. - С. 145 - 155.
9. *Яворовски З.* Жертвы Чернобыля: реалистичная оценка медицинских последствий Чернобыльской аварии // *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* - 1999. - Т. 44, № 1. - С. 19
10. *Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC.* Molecular mechanisms of DNA double strand break repair // *Trends Cell Biol.* 1998 Dec; 8(12): 483 - 489.
11. *Dikomey E, Dahm-Daphi J.* Workshop report: Techniques to Detect DNA Strand Breaks. Erlangen, Germany, 29 - 31 March 1993. *Radiat Environ Biophys.* 1994; 33(1): 85 - 88.
12. *Pfeiffer P., Gottlich N., Reichenberger S. et al.* // *Mutat. Res.* - 1996. - Vol. 366. - P. 69 - 86.
13. *Ward J.F.* // *Radiat. Res.* - 1995. - Vol. 66. - P. 427 - 432.
14. *Ward J.F.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1994. V. 66P.427-432:
15. *Moustacchi E.* Molecular mechanisms of carcinogenesis: the role of systems of DNA repair. *Bull Acad Natl Med.* 1998;182(1):33-46
16. *Mendorff-Dreikorn K. El., Chauvin Ch., Stor H. et al.* // *Cellular and Molecular Biology.* – 1999. Vol. 45 (2). - P. 211 - 218.
17. *Sachs L.* *Angewandte Statistik.* - Berlin: Springer-Verlag, 1997.
18. *Синицкий В.Н., Ковтун Т.В., Харченко Н.К. и др.* Патологические механизмы дезадаптации центральной нервной системы у людей, подвергшихся воздействию радиации // *Фізіол. журн.* - 1995. - Т. 41, № 3 - 4. - С. 55 - 66.
19. *Отчет по договору УНЦРМ № 1/98 "Мониторинг профилактики и коррекция нарушений состояния здоровья персонала, работающего на объекте "Укрытие", 1998.*

Поступила в редакцию 02.08.05,
после доработки - 09.08.05

48 СТАН ГЕНОМА ЛЮДИНИ ПРИ НИЗЬКОІНТЕНСИВНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ ВПЛИВАХ**С. Б. Мельнов, П. Г. Ритік, Н. Г. Кручинський, В. О. Ковальов, Л. А. Паламар, О. Ф.Сенюк**

Наведено результати стану генома осіб (кількості одностранных розривів ДНК), що зазнають тиску комплексного «чорнобильського фактора» у віддалені терміни після аварії на ЧАЕС. Отримані дані дали змогу виявити наявність у хронічно опромінюваних осіб підвищеного рівня одностранных розривів ДНК, які переважно мають адаптивний характер і ймовірно можуть бути пов'язані з нестабільністю генома. При цьому на організменному рівні наростання мутаційного тиску й посилення нестабільності генетичного апарата клітин пов'язане зі зміною ряду біологічних характеристик, зокрема індивідуальної реакції соматичних клітин постраждалих на додаткові мутагенні дії. Указані зміни можуть свідчити про існування потенційного ризику віддалених генетичних наслідків низькодозових радіаційних впливів.

48 STATE OF HUMAN GENOME AT LOW-DOSES ECOLOGICAL INFLUENCES**S. B. Mel'nov, P. G. Rytyk, N. G. Kruchynskyy, V. O. Kovalev, L. A. Palamar, O. F.Senyuk**

The results of analysis of the state of genome (amounts of single strand breaks in DNA) of the persons exposed to influence of complex «Chernobyl factor» in remote terms after a failure on ChNPP are resulted. Findings allowed to expose the increase of level of single strand breaks in DNA at the chronically irradiated persons mainly carry adaptive character and probably can be related to instability of genome. Thus at organism level growth of mutational pressure and strengthening of instability of cellular genome is related to the change of spectrum of biological characteristics, in particular individual reaction of somatic cells of victims on additional mutagenne influences. The indicated changes can testify to existence of potential risk of remote genetic consequences of long-term irradiation influences in low doses.