

**СОМАТИЧНИЙ ХРОМОСОМНИЙ МУТАГЕНЕЗ
В ПРИОРИТЕТНИХ ГРУПАХ НАСЕЛЕННЯ
УКРАЇНИ У ВІДДАЛЕНІ СТРОКИ ПІСЛЯ
АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АЕС**

С. С. Дибський, О. Б. Дибська, М. А. Пілінська

ДУ "Національний Науковий центр радіаційної медицини НАМН України", м. Київ

Ключові слова: іонізуюче випромінювання, лімфоцити периферичної крові людини, хромосомні аберації, нестабільність геному, аварія на Чорнобильській АЕС.

Аварія на Чорнобильській АЕС значно ускладнила екологічну ситуацію в Україні та на тлі вже існуючого техногенного забруднення сприяла розширенню контакту населення з одним із найпотужніших універсальних мутагенів — іонізуючим випромінюванням (ІВ), яке індукує пошкодження геному в усіх живих організмів, включаючи людину [1].

Наукові дослідження та клінічні спостереження, що проводилися протягом після-аварійного періоду, свідчать про погіршення стану здоров'я осіб, постраждалих внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС [2–3]. Не виключено, що цей феномен може бути наслідком радіоіндукованої дестабілізації геному людини, яка на цитогенетичному рівні проявлялася підвищеною частотою аберацій хромосом в лімфоцитах периферичної крові опромінених осіб [4–5], а також посиленням чутливості геному соматичних клітин до дії інших мутагенів фізичної та хімічної природи [6].

У віддалені строки після Чорнобильської аварії на перший план виступають дослідження не стільки прямих (мішеневих) мутагенних ефектів іонізуючої радіації в опромінених клітинах, як так званих дисгеномних (немішеневих) ефектів, серед яких провідне значення для реалізації променевого ураження людини мають різні форми радіаційно-індукованої нестабільності геному [7].

На цитогенетичному рівні важливу роль в дестабілізації геному людини відіграє прихована, затримана та трансмісивна хромосомна нестабільність. Тому у віддалені строки після променевого ураження людини особливої актуальності набуває не тільки дослідження закономірностей зберігання та елімінації мішеневих цитогенетичних ефектів, але й розробка нових методичних підходів до виявлення та

оцінки немішеневих цитогенетичних ефектів, провідним компонентом яких є саме різні форми хромосомної нестабільності.

Враховуючи вищезазначене метою проведених досліджень було визначення закономірностей реалізації впливу іонізуючого випромінювання на спадкові структури соматичних клітин людини у віддалені строки після аварії на Чорнобильській АЕС та обґрунтування цитогенетичних критеріїв оцінки нестабільності геному для формування “груп ризику” серед осіб з хромосомною нестабільністю.

Матеріал та методи дослідження. Для дослідження “немішеневих” ефектів іонізуючого випромінювання у осіб, постраждалих внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, вперше в Україні нами були використані такі новітні методичні підходи:

- розробка та апробація нової модельної системи для дослідження “затриманої” хромосомної нестабільності: двотермінове культивування лімфоцитів периферичної крові людини (не тільки стандартна коротко-тривала 48-ми-годинна інкубація, але й довгострокове 144-х-годинне культивування), що давало змогу аналізувати клітини першої та п’ятої клітинних генерацій, відповідно;

- розробка та апробація нової модельної системи для дослідження прихованої хромосомної нестабільності із застосуванням в якості мутагена—провокатора *in vitro* протипухлинного антибіотика — радіоміметика блеоміцина (в кінцевих концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл, на стадії G₂ мітотичного циклу).

Статистичну обробку результатів проводили стандартними методами варіаційної статистики, порівняння емпіричних сукупностей проводили за критерієм Стьюдента. Для обробки отриманих результатів було створено базу даних всіх клітин з хромосомними aberracіями в програмі Excel та використано пакети аналізу програм STATISTICA і MATLAB.

Всього в ході виконання досліджень проведено цитогенетичне обстеження 103 осіб та проаналізовано більш ніж 86 500 метафаз.

Результати дослідження та їх обговорення. Двотермінове культивування лімфоцитів було використано при цитогенетичному обстеженні двох груп дітей, народжених від батьків, в яких іонізуюче випромінювання виступало як виробничий (учасники ліквідації аварії на ЧАЕС) чи екологічний (мешканці забрудненої радіонуклідами цезію місцевості, які одержали так званий “йодний удар” у 1986 р.) фактори шкідливості. Групою порівняння слугували діти, народжені від неопромінених батьків, які мешкали у сприятливих за радіаційною ситуацією екологічних умовах.

Для визначення фонової частоти та спектру хромосомних аберацій використовували традиційне короткотривале (48-годинне) культивування лімфоцитів, що дозволяло аналізувати клітини переважно першого мітотичного поділу. Для виявлення прихованих потенційних змін ДНК, які можуть проявитися через декілька клітинних поколінь у вигляді затриманої хромосомної нестабільності, використовували нестандартне довгострокове (144-годинне) культивування лімфоцитів, що дозволило аналізувати клітини ~ п'ятого мітотичного циклу.

Узагальнені результати цих досліджень підсумовані в табл. 1.

При аналізі одержаних даних ми намагалися оцінити внесок радіаційної компоненти (опромінення батьків) в цитогенетичний ефект, який спостерігався у їх дітей, а також визначити значення термінів культивування лімфоцитів для експресії цього ефекту. Порівняння результатів цитогенетичного обстеження дітей в залежності від специфіки опромінення батьків показало (табл. 1), що по відношенню до групи порівняння як при стандартному короткотривалому, так і при довгостроковому культивуванні лімфоцитів спостерігали вірогідне ($p < 0,01$) прискорення темпів спонтанного хромосомного мутагенезу тільки в групі дітей, які народилися від опромінених батьків і про-

Таблиця 1. Порівняння результатів цитогенетичного обстеження дітей, які народилися від експонованих та неекспонованих батьків

Обстежені групи дітей	Частота хромосомних аберацій на 100 лімфоцитів за термінами культивування (годин)		p
	48	144	
Народжені від неопромінених батьків, група порівняння (n=21)	1,25±0,11	1,69±0,16	>0,05
Народжені від учасників ліквідації аварії на ЧАЕС (n=17)	1,46±0,15	2,04±0,20	<0,05
p	> 0,05	> 0,05	
Народжені від неопромінених батьків, група порівняння (n=21)	1,25±0,11	1,69±0,16	>0,05
Народжені від батьків, які мешкають на радіаційно забрудненій території, с. Старе, де щільність забруднення ґрунту ^{137}Cs складає 50,0 кБк/м ² (n=16)	2,09±0,17	3,24±0,23	<0,01
p	<0,01	<0,01	

живають на контамінованій радіонуклідами території. Не виключено, що проживання в місцевості, забрудненій радіонуклідами цезію, може сприяти дестабілізації геному як модифікуючий фактор, що підвищує чутливість хромосом соматичних клітин до інших мутагенних чинників, оскільки дози опромінення цих батьків могли бути значно меншими, ніж дози опромінення УЛНА.

Звертає на себе увагу, що 144-годинне культивування лімфоцитів, при якому аналізувалися клітини переважно 5-го мітотичного циклу, дозволило виявити приховані пошкодження геному у дітей, народжених від опромінених батьків, — цитогенетичний ефект в обох експонованих групах дітей був вірогідно підвищений в порівнянні з результатами, одержаними при короткотривалому культивуванні ($p<0,05$; $p<0,01$, відповідно), що може свідчити про реалізацію затриманої хромосомної нестабільності в довгострокових культурах лімфоцитів.

Зростання частоти хромосомних аберацій у 5-й клітинній генерації в групі дітей, народжених від батьків з контамінованої радіонуклідами території, як і у відповідній групі дітей, народжених від учасників ліквідації аварії на ЧАЕС (УЛНА), в яких дозове навантаження становило від 40 до 670 мГр, підтверджують можливість експресії віддаленої хромосомної нестабільності в послідовних мітозах. Підвищення рівня обмінних аберацій хромосомного типу — стабільних (аномальні моноцентрики) та нестабільних (центричні кільця) свідчить як про реальність трансгенераційного феномену хромосомної нестабільності у нашадків другої групи, так і про дестабілізацію їх геному через несприятливу екологічну ситуацію в місці проживання — у нашадків першої групи.

У дітей, народжених від УЛНА, у більшості випадків (88%) цитогенетичний ефект при обох строках культивування лімфоцитів був ідентичним; у 12% обстежених частота хромосомних аберацій була вірогідно вища при 144-годинному культивуванні.

У нашадків опромінених радіоіодом батьків з контамінованих радіоцезієм територій зросла частка випадків з вірогідним підвищенням хромосомної нестабільності у 5-му мітозі, яка досягла значення 25%, що у два рази більше, ніж у дітей, народжених від ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС.

Такий ефект через 18 років після аварії може бути зумовлений характерною особливістю зони Полісся — високим коефіцієнтом переходу радіоцезію з ґрунту в рослини і акумуляцією його в продуктах харчування (особливо в молоці та картоплі, де його вміст більше ніж в 5 разів перевищував дозволену норму), тобто продовженням внутрішнього

опромінення. Не можна виключити також і трансмісивну (трансгенераційну) хромосому нестабільність, що експресується у нащадків батьків, опромінених радіоізотопами йоду. Саме ефект передачі через опромінені статеві клітини батьків стану нестабільності геному першому поколінню їх нащадків вважається на сьогодні однією з найбільш актуальних проблем радіаційної генетики, для вирішення якої розробляються різні методичні підходи, як на хромосомному, так і на молекулярному рівнях [8].

На цитогенетичному рівні, окрім затриманої хромосомної нестабільності, важливу роль в дестабілізації геному людини відіграє так звана прихована хромосомна нестабільність при нормальному чи аберантному каріотипі, яка проявляється як гіперчутливість хромосом лімфоцитів периферичної крові до дії інших мутагенів — *in vivo* та *in vitro*.

По-перше, нами були визначені оптимальні строки обробки культури лімфоцитів блеоміцином (пізня постсинтетична G₂ стадія мітотичного циклу) та відповідні концентрації препарату (0,05 та 5,0 мкг/мл), придатні для оцінки чутливості хромосом соматичних клітин людини *in vitro* до тестуючого мутагенного навантаження.

На наступному етапі роботи були сформовані групи осіб з радіаційним впливом різної інтенсивності в анамнезі, в яких визначено фонові (виходні) частоти всього спектру хромосомних аберацій в лімфоцитах периферичної крові та проведено порівняльну міжгрупову оцінку інтенсивності опромінення за цитогенетичними критеріями — сумарної частоти нестабільних (дицентричні та кільцеві хромосоми) та стабільних (аномальні моноцентрики) хромосомних аберацій.

Встановили, що найменш обтяженою з експонованих груп виявилася група осіб, які працювали в 30-кілометровій зоні відчуження у 2006–2007 рр. (хронічний радіаційний вплив малої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення). Середньогрупова частота радіогенних маркерів в цій групі дорівнювала контрольному та спонтанному рівням. Далі йдуть групи УЛНА (пролонгований радіаційний вплив середньої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення у 1986–1987 рр.) та особи, які перенесли гостру променеву хворобу (ГПХ) у 1986 р. (гострий радіаційний вплив значної інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення у 1986 р.), в яких навіть у віддалені строки після опромінення спостерігали підвищені частоти як залишкових (неелімінованих) нестабільних хромосомних маркерів радіаційної дії, так і первинних радіаційно-індукованих стабільних хромосомних аберацій.

На завершальному етапі досліджень особи з усіх груп спостереження були протестовані за допомогою “G₂-bleomycin sensitivity assay” для

ПРОБЛЕМИ РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНІ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ. Випуск 16

дослідження індивідуальної чутливості хромосом лімфоцитів периферичної крові до тестуючого мутагенного навантаження та її можливої модифікації опроміненням різної інтенсивності.

Результати такого тестування наведені в графічному вигляді на рисунку 1 на якому наочно спостерігається як широке міжіндивідуальне варіювання цитогенетичного ефекту при тестуючій дії блеоміцину в обох використаних концентраціях, так і відсутність позитивної кореляції поміж фоновими та індукованими частотами хромосомних аберацій в усіх обстежених групах.

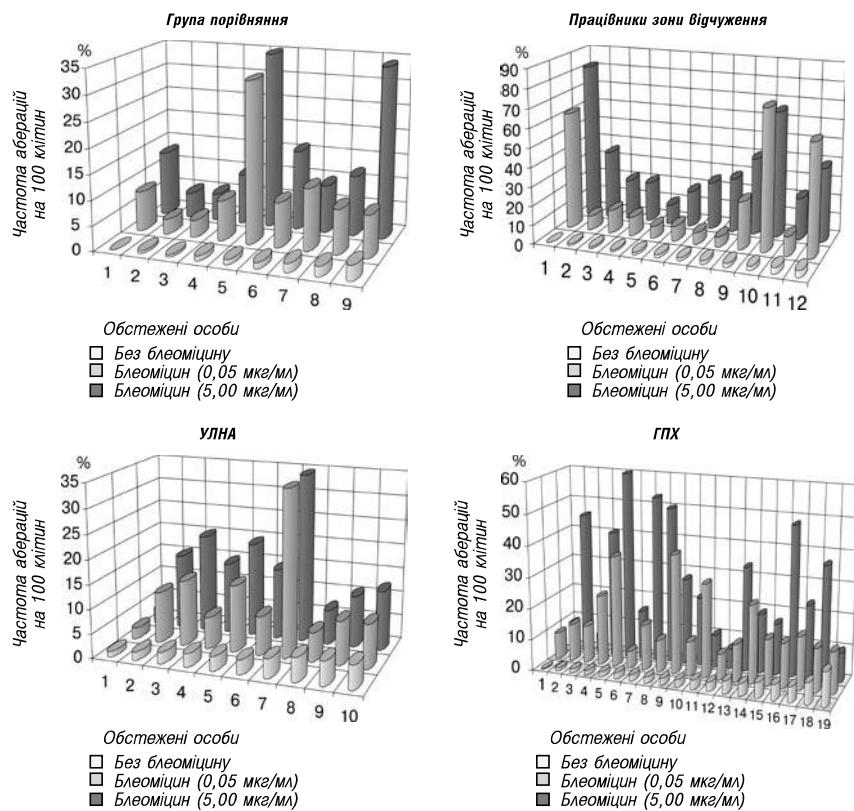


Рис. 1. Порівняння індивідуальних результатів цитогенетичного аналізу обстежених осіб

Визначення осіб, гіперчутливих до дії блеоміцину, проводили аналогічно виявленню індивідів з підвищеною чутливістю до дії іонізуючої радіації [9] обчисленням коефіцієнту прихованої хромосомної нестабільності (K_{PHH}) за спрощеною нами формулою:

$$K_{PHH} = M_{PHH} / M, \quad (1)$$

де M_{PHH} — індивідуальні значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеоміцину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл; M — середньогрупові значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеоміцину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл.

Прийняли, що для гіперчутливих осіб цитогенетичний ефект, індукований блеоміцином, перевищує середньогруповий рівень хромосомних аберацій і завжди буде >1 .

При порівнянні міжгрупової чутливості до кластогенної дії блеоміцину брали до уваги виявленість осіб з прихованою хромосомною нестабільністю та додаток до фонової частоти хромосомних аберацій (надспонтанний рівень) в кожній із обстежених груп, які були розподілені в залежності від частоти цитогенетичних маркерів опромінення. Результати такого порівняння наведені в таблиці 2.

Як видно з наведених даних, максимальний відсоток осіб з прихованою хромосомною нестабільністю (57,9%) виявили в групі осіб, які перенесли ГПХ у 1987 р.; в інших групах кількість гіперчутливих індивідів була практично однаковою і не перевищувала 41,6%. Разом з тим, максимальний додаток до середньогрупової частоти аберацій

Таблиця 2. Порівняння середньогрупових результатів тестування обстежених осіб за допомогою “G₂-bleomycin sensitivity assay”

Обстежені групи	Гіперчутливі особи, %	Додаток до фонової частоти аберацій на 100 клітин під впливом блеоміцину (мкг/мл)	
		0,05	5,00
Група порівняння	33,3	9,14	14,31
Працівники 30-кілометрової зони відчуження	41,6	22,00	32,34
Учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС	40,0	7,95	11,79
Особи, які перенесли ГПХ у 1986 р.	57,9	13,47	24,71

хромосом (22,00 та 32,34 на 100 метафаз при концентраціях блеоміцину 0,05 та 5,00 мкг/мл, відповідно) спостерігали у працівників 30-кілометрової зони відчуження, що, можливо, пов'язано зі специфікою опромінення осіб в обстежених групах.

Отримані результати підтверджують реальність модифікації генетично зумовленої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження внаслідок дії іонізуючого випромінювання [10].

Висновок. Таким чином, використання нових підходів до оцінки віддалених “немішеневих” цитогенетичних ефектів як наслідків по-переднього опромінення людини дозволило виявити різні форми радіаційно-індукованої нестабільності геному в деяких пріоритетних групах осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, які можливо вважати фактором ризику реалізації патології з генетичною компонентою.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гродзинський, Д. М. Радіобіологія [Текст] / Д. М. Гродзинський. — К.: Либідь, 2000. — 448 с.
2. Бебешко, В. Г. Медичні наслідки Чорнобильської аварії [Текст] / В. Г. Бебешко // Проблеми радіаційної медицини та радіобіології: зб. наук. праць: — 2005. — Вип. 11. — С. 5–24.
3. Постнатальные эффекты у детей, облученных в период внутриутробного развития в результате аварии на Чернобыльской АЭС [Текст] / Е. И. Степанова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 45, № 5. — С. 523–529.
4. Shemetin, O. V. Detection of radioinduced bystander effect at cytogenetic level with the help of mixed human lymphocytes culture [Text] / O. V. Shemetin, O. O. Talan, M. A. Pilinskaya // Chromosome Research. — 2007. — Vol. 15, Suppl.1. — P. 58.
5. Степанова, Е. И. Отдаленные цитогенетические эффекты у детей, облученных внутриутробно в результате аварии на Чернобыльской АЭС [Текст] / Е. И. Степанова, Ж. А. Мишарина, Е. Ю. Вдовенко // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2002. — Т. 42, № 6. — С. 705–709.
6. Педан, Л. Р. Оцінка стабільності хромосом лімфоцитів периферичної крові осіб, постраждалих від дії факторів Чорнобильської аварії, за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro* / Л. Р. Педан, М. А. Пілінська [Текст] // Доповіді Національної академії наук України. — 2004. — № 12. — С. 175–179.
7. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response [Text] / L. Smith [et al.] // Health Physics. — 2003. — Vol. 85, № 1. — P. 23–29.
8. Воробцова, И. Е. Генетические и соматические эффекты ионизирующей радиации у человека и животных (сравнительный аспект) [Текст] / И. Е. Воробцова // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2002. — Т. 42, № 6. — С. 639–643.
9. Дъюміна, Е. А. Індивідуальна радіочутливість людини [Текст] / Е. А. Дъюміна, М. О. Дружіна, Н. М. Рябченко. — К.: ЛОГОС, 2006. — 126 с.
10. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity [Text] / Jarno Tuimala [et al.] // Mutagenesis. — 2006. — Vol. 21, № 4. — P. 261–264.

СОМАТИЧЕСКИЙ ХРОМОСОМНЫЙ МУТАГЕНЕЗ В ПРИОРИТЕТНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

С. С. Дыбский, Е. Б. Дыбская, М. А. Пилинская

ГУ “Национальный Научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, г. Киев

Для исследования “немишеневых” эффектов ионизирующего излучения у лиц, пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС, были использованы культивирование лимфоцитов периферической крови человека (стандартная 48-часовая кратковременная инкубация, и долгосрочное 144-часовое культивирование) и провокационный мутагенез антибиотиком-радиомиметиком блеомицином (в конечных концентрациях 0,05 и 5,00 мкг/мл, на стадии G₂ митотического цикла). Долгосрочное культивирование лимфоцитов, при котором анализировались клетки преимущественно 5-го митотического цикла, позволило выявить скрытые повреждения генома у детей, рожденных от облученных родителей — цитогенетический был достоверно повышен в сравнении с результатами, полученными при кратковременном культивировании, что может свидетельствовать о реализации задержанной хромосомной нестабильности. Среди лиц, перенесших острую лучевую болезнь, выявлено 57,9% лиц со скрытой хромосомной нестабильностью; в других группах количество гиперчувствительных индивидуумов было практически одинаковым и не превышало 41,6%.

Полученные результаты подтверждают реальность модификации генетически обусловленной чувствительности хромосом соматических клеток человека к тестирующей мутагенной нагрузке вследствие воздействия ионизирующего излучения.

Ключевые слова: *ионизирующее излучение, лимфоциты периферической крови человека, хромосомные aberrации, нестабильность генома, авария на Чернобыльской АЭС.*

SOMATIC CHROMOSOMAL MUTAGENESIS IN PRIORITY GROUPS OF UKRAINE POPULATION IN REMOTE TERMS FOLLOWING THE CHORNOBYL ACCIDENT

S. S. Dibskiy, Ye. B. Dibskaya, M. A. Pilinskaya

*SI “National Research Centre for Radiation Medicine,
National Academy of Medical Science of Ukraine”, Kyiv*

For detection of late untargeted cytogenetic effects (chromosome instability) in remote terms following Chornobyl accident high priority groups with different intensity of radiation exposure had been voluntary observed. Two-termed (during 48 and 144 hours) cultivation of peripheral blood lymphocytes and modified G₂-bleomycin sensitivity assay were used. In children born to irradiated parents increased frequency of chromatid breaks in long-term cultures confirmed expression of delayed chromosome instability in consequent mitosis; appearance of stable aberrations may testify about transmissible chromosome instability. Among unexposed donors, liquidators and shelter’s personnel no more than 41.6% persons hypersensitive to testing bleomycin exposure had been identified that can be considered as genetically caused phenomenon. Among patients recovered from acute radiation sickness ~58% persons expressed hidden chromosome instability that confirmed possibility of modification of inherited chromosome susceptibility to mutagens by high doses of ionizing radiation.

Key words: *ionizing radiation, human peripheral blood lymphocytes, chromosome aberrations, genome instability, Chornobyl accident.*