

УДК 577.21+574:-0.73756.5

УРОВЕНЬ КЛАСТОГЕННЫХ ФАКТОРОВ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ОБЩЕГО МУТАЦИОННОГО ДАВЛЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕКА

М.С. МОРОЗИК, С.Б. МЕЛЬНОВ

(Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, Минск),

П.М. МОРОЗИК

(Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск)

Установлено, что под влиянием сыворотки крови лиц, подвергшихся острому или хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в культуре кератиноцитов с мутантным геном *p53*, отмечается повышенный выход микроядер, что свидетельствует о наличии кластогенных факторов. Полученные данные указывают на потенциальную опасность низкодозовых радиационных воздействий и длительном сохранении эффекта радиационного воздействия *in vivo*.

Введение. В настоящее время в научном сообществе проводится широкомасштабная дискуссия о генетическом эффекте низкодозовых радиационных воздействий. Одной из причин этого является загрязнение обширных территорий Беларуси, России и Украины радиационными выбросами, имевшими место в ходе аварии на Чернобыльской АЭС. Другая причина - ряд недавно открытых феноменов, таких как адаптивный ответ, радиационно-индуцированный байстендер эффект (РИБЭ), кластогенные факторы и т.д., существенно изменивших наши представления как об эффективности такого рода воздействий, так и о механизмах их возникновения.

В ряде работ [1-5] было показано, что в сыворотке крови лиц, пострадавших в результате ликвидации последствий аварии на ЧАЭС или проживания на загрязненной радионуклидами территории, наблюдалось повышенное содержание кластогенных факторов (КФ), которые впервые были обнаружены в плазме у лиц, подвергшихся случайному воздействию ионизирующих излучений или получавших радиотерапию [6 - 7]. Биохимическим путем было установлено, что КФ представляют собой смесь прооксидантов, обладающих хромосомоповреждающими свойствами. Кластогенные факторы образуются не только в результате действия ионизирующего излучения, но также наблюдаются и при различных патологических состояниях - у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями соединительной ткани и пищеварительного тракта, ВИЧ-инфекциями. Кластогенные факторы, т.е. повреждающие хромосомы, присутствуют в плазме при многочисленных патологических состояниях, сопровождаемых окислительным стрессом.

Формирование этих так называемых кластогенных факторов и их повреждающее действие опосредуются через супероксидные анион-радикалы, в то время как супероксид дисмутазы (СОД) ингибирует их действие. Поэтому Emerit в 1997 году [4] был предложен термин «супероксид-опосредованный кластогенез». В экспериментах с меченой флуоресцентной меткой СОД было показано, что этот фермент защищает клетки не только путем нейтрализации экстраклеточных супероксидных радикалов, а также путем связывания с поверхностью клеток, в особенности моноцитов и макрофагов. В результате продукция супероксидных радикалов этих клеток снижается, что вторично ведет к снижению формирования кластогенных факторов.

Супероксидные радикалы являются не прямыми ДНК-повреждающими агентами, а инициаторами целой серии событий, приводящих к формированию кластогенных факторов. При биохимическом анализе процесса формирования КФ было обнаружено 3 основных класса химических веществ:

- 1) продукты перекисного окисления липидов - гидроперекись, малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненал, образующиеся из арахидоновой кислоты мембран;
- 2) цитокины - альфа-фактор некроза опухолей;
- 3) нуклеотиды - инозин-ди- и трифосфат.

Формирование КФ через образование супероксидных радикалов, а также обратный процесс образуют цепь (порочный круг), ответственную за самовоспроизводящийся во времени окислительный стресс и долгосрочные генотоксические эффекты.

По данным Эмерит [8], ультрафильтрат крови ликвидаторов при введении в тестовую культуру (лимфоциты периферической крови) приводил к значительному увеличению частоты хромосомных aberrаций и может быть оценен так называемой истинной величиной кластогенности. Похожий эффект наблюдался и у детей, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС [4].

По-видимому, эффект кластогенных факторов можно рассматривать как проявление одной из форм байстендер-эффекта *in vivo* - передача сигнала обеспечивается молекулами-мессенджерами, распространяющимися в жидкой фракции крови.

В экспериментах Mothersill [9] была доказана возможность индуцирования байстендер-эффекта при у-облучении путем переноса питательной среды от облученных клеток необлученным. В таких экспериментах среда минимум через час после облучения (после формирования фактора, вызывающего РИБЭ) фильтруется (диаметр пор < 0,2 мкм) во избежание наличия в ней облученных клеток и переносится клеткам-реципиентам.

Было также показано [10] что культуральная среда клеток, облученных низкими дозами альфа-частиц, перенесенная необлученным клеткам, может индуцировать увеличение обменов между сестринскими хроматидами. Индуцирующие РИБЭ факторы непосредственно продуцируются только облученными клетками, с культур которых и собирается среда. В этих экспериментах РИБЭ наблюдался минимум через 24 часа после облучения. Факторы, индуцирующие РИБЭ в культуральной среде доноров, также вызывают увеличение внутриклеточного уровня кислородных радикалов, включая супероксид и гидроксил водорода, которые считаются критическими посредниками в развитии повреждения.

В последние несколько десятков лет РИБЭ очень активно изучается, но его механизм до сих пор точно не известен. В литературе рассматриваются 2 возможных механизма его формирования: через межклеточные контакты (опосредуется действием белка *p53* и индуцируемого им *CDKN1A/p21* - белка, вовлеченного в контроль точек рестрикции клеточного цикла) [11, 12], а также через секрецию во внеклеточную среду специфических факторов (это могут быть цитокины или факторы, увеличивающие внутриклеточный уровень различных форм активного кислорода) [10, 13 - 16]. Также было показано, что первый механизм не обязателен для формирования РИБЭ [17].

В настоящей работе нами проведена оценка уровня кластогенных факторов в сыворотке крови ликвидаторов 1986 - 1987 гг. и группы работников Полесского государственного радиационного заповедника (ПГРЗ), работающих в условиях повышенного радиационного фона.

Материалы и методы исследований

Объект исследований - ликвидаторы 1986 - 1987 гг. (7 пациентов); группы (6 пациентов) работников Полесского государственного радиационного заповедника (ПГРЗ); контрольная группа - 11 лиц, не имевших контакта с дополнительными радиационными воздействиями, и соответствующие пациентам основной группы в возрастно-половом аспекте.

Методика исследований - у пациентов и лиц контрольной группы проводили забор крови с соблюдением всех правил асептики и антисептики в вакутейнеры для получения сыворотки («Becton Dickinson»), центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, стерильно отбирали сыворотку, разливали на аликвоты по 1 мл, замораживали и хранили при минус 20 °С до использования. Перед заморозкой сыворотка фильтровалась через 0,22 мкм фильтр «Nalgene» с целью удаления всех компонентов, способных нарушить рост культуры, а также с целью удаления всех резидуальных клеточных компонентов крови.

Тест-система - кератиноциты человека, иммортализованные вирусом папилломы человека HPV 16 (HPV-G клетки). В этой культуре отсутствуют протейны p53 и RB в связи с их связыванием E6 и E7.

Кератиноциты человека культивировались в смеси сред Дульбеко MEM и F12 (T.1) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, стандартного количества смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин), 1 % L-глутамина и 1 мкг/мл гидрокортизона («Gibco», Irvine, UK) в 80 см² флаконах. Клетки инкубировались в термостате при 37 °С в присутствии 5 % CO₂.

При конfluenceности в 80... 100 % среда из флакона с клеточной культурой удалялась, клетки промывались стерильным PBS и вносилось 10 мл смеси версена (ЮнМ) и трипсина (0,25 % в сбалансированном солевом растворе Хэнкса) в соотношении 1:1 («Gibco», Irvine, UK) и помещались в термостат на 11 мин для отделения клеток со дна флакона. Затем клеточную суспензию добавляли в равное количество среды Дульбеко MEM F-12 с целью нейтрализации трипсина. В таком состоянии клетки могут быть посеяны в необходимом количестве.

Для экспериментальной работы суспензия высевалась в малые культуральные флаконы (24 см²) в количестве 1 мл (6·10³ клеток) с добавлением 5 мл полной среды.

Введение сыворотки в культуру производилось через 1...2 суток после посева, и клетки вновь помещались в термостат. Через 1... 1,5 часа вводился цитохалазин B в концентрации 7мкг/мл, после чего клетки вновь инкубировались в течение 24 часов. Затем удаляли культуральную среду, промывали физиологическим раствором и фиксировали клетки охлажденным фиксатором Карнуа (3 смены фиксатора, время фиксирования - 10...15 мл). Затем флаконы высушивались при 37 °С и окрашивались 10 %-ным раствором Романовского - Гимзы.

Подсчет микроядер проводился на инвертированном микроскопе при увеличении x400. Результаты подсчета (в анализ брали 1000 биядерных клеток/флакон) регистрировали с учетом количества микроядер на одну биядерную клетку.

Результаты и обсуждение. Микроядерный анализ в настоящее время широко используется как для генетического мониторинга популяций, так и для оценки мутагенных эффектов *in vitro*. Этот метод

также применим и для оценки индивидуальной чувствительности как к физическим, так и к химическим мутагенам [18].

Основные результаты исследований представлены в таблице.

Кластогенный эффект сыворотки различных групп населения

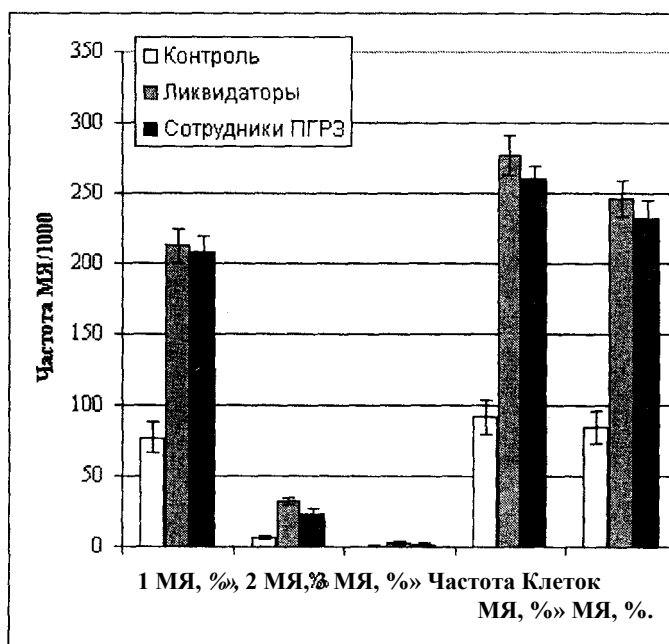
Группа	Число клеток в анализе	Частота клеток с микроядрами (МЯ), %			Частота МЯ, %	Частота клеток сМЯ, %
		1 МЯ	2МЯ	3МЯ		
Контроль	11000	77,4 ± 11,1	6,5 ± 1,6	0,44 ± 0,3	91,8 ± 12,4	84,3 ± 11,5
Ликвидаторы	7000	212,2 ± 12,2	31,6 ± 2,6	2,49 ± 1,1	277,4 ± 14,0	246,1 ± 13,3
Сотрудники ПГРЗ	6000	207,8 ± 10,9	22,7 ± 3,8	1,9 ± 0,1	260,3 ± 18,3	232,2 ± 13,1

По частоте клеток с микроядрами и частоте микроядер в контроле можно судить об уровне спонтанного мутагенеза (он сравнительно невысок). Данные таблицы убеждают нас в том, что невелика доля клеток с двумя микроядрами и ничтожна с тремя, основная масса клеток имеет одно микроядро. Совершенно противоположные результаты в опытных вариантах.

Данные, представленные в таблице, убедительно свидетельствуют о том, что у лиц, подвергающихся хроническому радиационному воздействию (сотрудники ПГРЗ), наблюдается явное нарастание мутационного давления, что выражается в существенном увеличении частоты микроядер (практически в 3 раза относительно уровня контроля - $277,4 \pm 14,0$ % против $91,8 \pm 12,4$ %, $P < 0,01$), при этом отмечается существенное нарастание частоты клеток с несколькими микроядрами (в среднем количество клеток с двумя и тремя микроядрами увеличено в 3...4 раза). Таким образом, представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что хроническое низкоинтенсивное радиационное воздействие существенно влияет на уровень накопления кластогенных факторов.

Практически аналогичная картина имеет место и при сравнительном анализе частоты индукции микроядер между контрольной группой и группой ликвидаторов (лиц, подвергшихся достаточно выраженному, но кратковременному воздействию радиационного фактора).

Так, общая частота микроядер $260,3 \pm 18,3$ и частота клеток с микроядрами $232,2 \pm 13,1$ у ликвидаторов статистически достоверно отличается от соответствующих показателей контроля (в обоих случаях $P < 0,01$). Так же, как и в случае работников ПГРЗ, отмечается явное и высокодостоверное нарастание частоты клеток с несколькими микроядрами (рис. 1).



Частота моно- и полимикроядерных клеток, индуцированных сывороткой пациентов различных групп

В то же время, сравнительный анализ групп ликвидаторов и сотрудников ПГРЗ по данным рисунка наглядно демонстрирует отсутствие между ними статистически значимых различий. Последнее может свидетельствовать о том, что остаточные эффекты предшествовавшего радиационного воздействия могут быть зафиксированы и в отдаленные (более 15 лет с момента воздействия) сроки, что свидетельствует о

необходимости дальнейшего тщательного контроля и обследования пострадавших во время Чернобыльской аварии популяций. Следует отметить, что эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее на жителей Хиросимы [6]. В то же время данные о кластогенном эффекте сыворотки сотрудников ППРЗ подтверждают ранее высказанные в некоторых наших предшествующих работах предположения о возможно высокой эффективности низкодозовых хронических радиационных воздействий [18].

В целом представленные данные указывают на эффективность использованного методического подхода, основанного на использовании культуральной клеточной линии с блокированной активностью гена p53 (с инактивированной одной контрольной точкой клеточного цикла).

ЛИТЕРАТУРА

1. Emerit I. Superoxide production by clastogenic factors. In: A. Crastes de Pauler, L. Douste-Blazy, R. Paoletti. Free radicals, lipoproteins and membrane lipids. - New-York: Plenum Press, 1990. - P. 99 - 104.
2. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor /1. Emerit, L. Cernjavski, R. Arutyunyan et al, // J. Cancer Res. Clin. Oncol., 1994, 120:558 - 561.
3. Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers. Anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract I. Emerit, N. Oganessian, T. Sarkisian et al. // Radiat. Res., 1995, 144:198.205.
4. Clastogenic factors in the plasma of children exposed at Chernobyl /1. Emerit, M. Quastel, J. Goldsmith et al. // Mutat. Res., 1997, 373:47 - 54.
5. Oxidative stress-related clastogenic factors in plasma from Chernobyl liquidators: protective effects of antioxidant plant phenols, vitamins and ligoelements /1. Emerit, N. Oganessian, R. Arutyunyan // Mutat. Res., 1997, 377:239-246.
6. Goh K.O., Sumner K. Breaks in normal human chromosomes: are they induced by a transferable substance in the plasma of irradiated persons exposed to total-body irradiation? // Radiat. Res., 1968, 6:51 - 60.
7. Hollowed H.G., Littlefield L.G. Chromosome damage induced by plasma from irradiated patients. An indirect effect of X-ray//Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, 129:240-244.
8. Emerit I. Clastogenic factors as biomarkers of oxidative stress after radiation exposure // Int J Radiat Med., 1999,2:25 - 33.
9. Mothersill C., Seymour C.B. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells//Int J Radiat Biol 1997; 71 (4):421 -427.
10. Lehnert B.E., Goodwin E.H. A new mechanism for DNA alterations induced by alpha particles such as those emitted by radon and radon progeny//Environ Health Perspect 1997; 105 Suppl 5:1095 - 1101.
11. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles / E.I. Azzam, S.M. de Toledo, T. Gooding, J.B. Little // Radiat Res 1998; 150:497-504.
12. Little High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts / E.I. Azzam, S. M. de Toledo, A.J. Waker, J.B. // Cancer Res, 2000; 60:2623 - 2631.
13. Iyer R., Lehnert B.E. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles // Cancer Research 2000; 60(5): 1290 - 1298.
14. Lehnert B.E., Goodwin E.H. Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells // Cancer Res 1997; 57:2164 — 2171.
15. Lyng F.M., Seymour C.B., Mothersill C. Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability? // Radiation Research 2002; 157:365 - 370.
16. Lyng F.M., Seymour C.B., Mothersill C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis // British Journal of Cancer 2000; 83:1223 - 1230.
17. Mothersill C., Seymour C.B. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium // Radiat Res 1998; 149:256-262.
18. Мельнов С.Б. Биологическая дозиметрия: теоретические и практические аспекты. - Мн.: Белорусский комитет «Дзеці Чарнобыля», 2002. - 192 с.