

ВПЛИВ МУТАГЕНІВ НА РІВЕНЬ АБЕРАЦІЙ ХРОМОСОМ У ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ НАЩАДКІВ УЧАСНИКІВ АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АТОМНІЙ СТАНЦІЇ

Багацька Н. В.¹, Ковальова В. І.²

1 - ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», м. Харків, Україна
2 - Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Згідно даних літератури і власних досліджень визначено негативний вплив мутагенів-провакаторів блеомицину та мітомицину С на лімфоцити крові нащадків опромінених батьків. Рівень хромосомних порушень збільшувався до 21,21 % після впливу блеомицину та до 17,77 % – після дії мітомицину С. При дії блеомицину значущо частіше реєструвалися парні ацентричні фрагменти порівняно з дією мітомицину С на лімфоцити крові нащадків, народжених від учасників ліквідації наслідків на Чорнобильській аварії.

Ключові слова: хромосоми, аберації, мутагенез, нащадки, Чорнобильська аварія

ВЛИЯНИЕ МУТАГЕНОВ НА УРОВЕНЬ АБЕРАЦИЙ ХРОМОСОМ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПОТОМКОВ УЧАСТНИКОВ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АТОМНОЙ СТАНЦИИ

Багацька Н. В., Ковальова В. І.

Согласно данным литературы и собственных исследований установлено негативное влияние мутагенов-провакаторов блеомицина и митомицина С на лимфоциты крови потомков облученных отцов. Уровень хромосомных нарушений увеличился до 21,21 % после влияния блеомицина и до 17,77 % – после действия митомицина С. При действии блеомицина значимо чаще регистрировались парные ацентрические фрагменты в сравнении с действием митомицина С на лимфоциты крови потомков, рожденных от участников ликвидации последствий на Чернобыльской аварии.

Ключевые слова: хромосома, аберації, мутагенез, потомки, Чернобыльская аварія

THE EFFECT OF MUTAGENS ON THE LEVEL OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN BLOOD LYMPHOCYTES IN DESCENDANTS OF THE PARTICIPANTS OF THE ACCIDENT AT THE CHERNOBYL NUCLEAR POWER PLANT

Bagatska N. V., Kovaleva V. I.

According to the data of literature and the own research, the negative influence of triggering mutagens bleomycin and mitomycin C on the lymphocytes of blood in descendants of irradiated fathers has been found. The level of chromosomal disorders increased to 21.21% after the influence of bleomycin and to 17.77% – after the impact of mitomycin C. At bleomycin impact on blood lymphocytes of descendants of Chernobyl disaster liquidators, paired acentric fragments were significantly more often in comparison with the effect of mitomycin C.

Keywords: chromosomes, aberrations, mutagenesis, descendants, Chernobyl disaster

ВСТУП

До цього часу залишається недостатньо оціненим вплив радіації на стан здоров'я нащадків опромінених батьків. За класифікацією ВООЗ, аварію на ЧАЕС відносять до числа глобальних, яка призвела до різноманітних широкомасштабних соціальних та медичних проблем. За більше ніж 34-річчя, що минуло після аварії на ЧАЕС, стає очевидним, що її вплив є більш складним, ніж передбачалося спочатку. Передусім, це обумовлено проблемами, що пов'язані з оцінкою наслідків радіаційного впливу на генетичний апарат учасників ліквідації наслід-

ків аварії (УЛНА) на Чорнобильській атомній станції, їхніх дітей, евакуйованих (дорослих та дітей) осіб, «ветеранів підрозділів особливого ризику», які піддавалися опроміненню при різних радіаційних аваріях тощо. Встановлено, що в експонованих групах у віддалені строки підвищується рівень нестабільних і стабільних хромосомних аберацій [Воробцова і Семёнов, 2006; Глазко і Глазко, 2013]. І на сьогодні, передусім, особливу увагу привертає молоде населення, тому що стан здоров'я дітей, які народилися у родинях УЛНА, характеризується високим рівнем загальної захворюваності та нестабільністю хромосом-

ного апарату [Балева и Сипягина, 2019]. Безперечно, діти, які народилися в цих сім'ях, не піддавалися дії іонізуючого опромінення, однак негативний вплив радіації на організм батьків може спричинити появу небажаних мутацій у наступного покоління та привести до ослаблення їх соматичного здоров'я. В експериментальних дослідженнях вплив іонізуючого опромінення на організм розглядається як фактор ризику генетичної нестабільності [Ковалева, 2008; Орадовская, 2016]. Відомо, що стабільність хромосомного апарату є полігенною ознакою, яка контролюється великою кількістю чинників і генів. Багато які фактори зовнішнього середовища призводять до мутацій генів, що контролюють синхронність ділення центросом на стадіях мітозу. Порушення даної синхронності спричиняє виникнення багатополюсного мітозу з подальшими помилками в розходженні по дочірнім клітинам [Верещако и др., 2018]. Також високий рівень геномної нестабільності соматичних клітин дітей ліквідаторів передбачає, що порушення розходження хромосом може розвиватися не лише в процесі мітотичного поділу соматичних клітин, але й в мейотичному поділі статевих клітин, що збільшує ризик народження дітей з хромосомними аномаліями в наступних поколіннях. Отже, однією з фунда-

ментальних проблем сучасної генетики залишається оцінка стабільності функціонування генетичного апарату, тому що пошкодження геному можуть становити основу порушень імунної та нейроендокринної систем, канцерогенезу та знижувати тривалість життя [Высоцкая и др., 2019; Nimker et al., 2019].

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Цитогенетичний аналіз був проведений у 21 дитини (8 хлопців і 13 дівчат), народженої в сім'ях УЛНА, та 20 здорових (8 хлопців і 12 дівчат) однолітків у віці 9-17 років, що були обстежені в лабораторії медичної генетики інституту. Цитогенетичне дослідження із застосуванням двох мутагенів-провокаторів проводили в одних і тих же дітей з обох груп порівняння протягом декількох років за загальноприйнятою методикою. Матеріалом слугували препарати хромосом, отримані з культури лімфоцитів периферичної крові (ЛПК). Культивували ЛПК у поживному середовищі РВ-МАХ (фірми Gibco, USA). Гомогенне забарвлення проводилося барвником Гімзи протягом 10-15 хвилин. За мутагени-провокатори для виявлення можливої прихованої хромосомної нестабільності використовували протипухлинні препарати – блеоміцин і мітоміцин С (табл. 1).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика дії мутагенів-провокаторів

Блеоміцин	Мітоміцин С
Синтезується бактеріями роду <i>Streptomyces verticillus</i> . Відноситься до цитотоксичних антибіотиків. Проявляє найбільшу активність в фазі G2 мітозу.	Продукується культурою актинобактерій <i>Streptomyces caespitosus</i> . Є алкілюючим антибіотиком. Найбільш виражена активність мітоміцину С спостерігається в пізніх (G1 і S) фазах мітозу.
У багатьох клітинах викликає хромосомні аберації: делеції, фрагментації і транслокації. Пригнічує синтез нуклеїнових кислот (переважно ДНК) і білка.	Викликає помилки зчитування інформації, і в підсумку, пригнічує синтез відповідних даному коду білків.
Взаємодія з ДНК супроводжується індукцією лабільності її молекули, розривом однієї або обох ланцюгів з подальшим утворенням вільних радикалів. Фрагментація ДНК імовірно є наслідком окислення комплексу ДНК-блеоміцин-Fe (II) і причиною хромосомних аберацій.	Має здатність ковалентно зв'язуватися з ДНК за допомогою алкільної групи та є основною причиною їх протиракової дії, тобто після проникнення в клітину проявляє властивості функціонального алкілюючого агента і вибірково пригнічує синтез ДНК.

Відомо, що традиційні хіміотерапевтичні агенти є цитотоксичними, оскільки вони втручаються в процес клітинного ділення. Більшість цитостатичних препаратів викликають залежне від дози збільшення частоти хромосомних аберацій і сестринських хроматидних обмінів у ЛПК людини *in vitro* та *in vivo*. Ці препарати можуть викликати анеуплоїдію і поліпло-

їдію більшою мірою, ніж хромосомні аберації.

При цитогенетичному обстеженні дітей УЛНА та здорових однолітків розраховували такі показники: частоту аберацій на 100 клітин, загальний рівень аберацій хроматидного, хромосомного та геномного типів та окремих типів хромосомних порушень. Метафазні пластинки досліджувалися на бінокуляр-

ному мікроскопі Leica Gallen III (Австрія), окуляр 10x18, об'єктив 100x, біокулярна насадка 1,25x.

Статистична обробка отриманих результатів проводилася за критерієм Ст'юдента для пов'язаних сукупностей із застосуванням програм Excel.

При проведенні цитогенетичного дослідження дотримувалися принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про захист прав і гідності людини щодо застосування в біології та медицині, відповідних законів України. Протокол дослідження ухвалений Комітетом з біоетики та деонтології ДУ «ІОЗДП НАМН».

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дітей, народжених у сім'ях УЛНА, сумарна частота аберацій хромосом після впливу мутагену блеоміцину на ЛПК у дівчат склала 21,6 на 100 клітин, у хлопців – 19,2.

Аберації хроматидного та хромосомного типів реєструвалися з однаковою частотою в групах дівчат та хлопців, найчастіше виявлялися одиночні та пар-

ні ацентричні фрагменти, зрідка – кільцеві та дицентричні хромосоми, обміни.

Серед порушень геномного типу превалювали поліплоїдні клітини, а вірогідні відмінності встановлено лише у частоті тотального ушкодження клітин, яке превалювало в ЛПК дівчат (1,76 % проти 0,68 % у хлопців, $p < 0,05$) (рис. 1).

Аналіз впливу на лімфоцити крові дівчат і хлопців УЛНА іншого мутагену мітоміцину С свідчив про відсутність значущих відмінностей у рівні хромосомних порушень (рис.2).

Загальна частота хромосомних порушень (хроматидного, хромосомного та геномного типів) внаслідок дії мутагену-провокатора блеоміцину на ЛПК дітей УЛНА склала 21,2 %, а мутагенний вплив мітоміцину С дорівнював 17,8 %, тобто вплив блеоміцину перевищував дію мітоміцину С в 1,2 рази. Рівень аберацій хромосомного типу під час дії мутагену блеоміцину дорівнював 9,7 %, натомість мутагенний вплив мітоміцину С становив 7,9 %, що підтверджує більш виражений вплив мутагену блеоміцину на ЛПК дітей УЛНА (рис. 3).

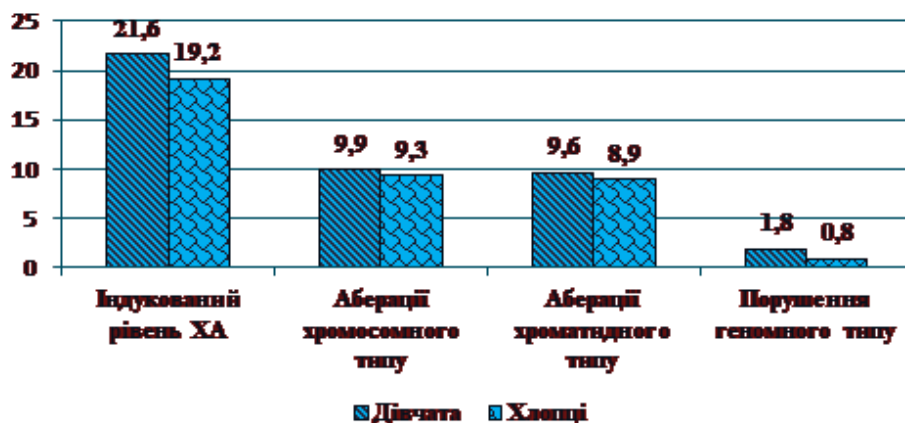


Рис. 1. Порівняння частоти хромосомних аберацій у дітей УЛНА після дії блеоміцину на лімфоцити крові, %

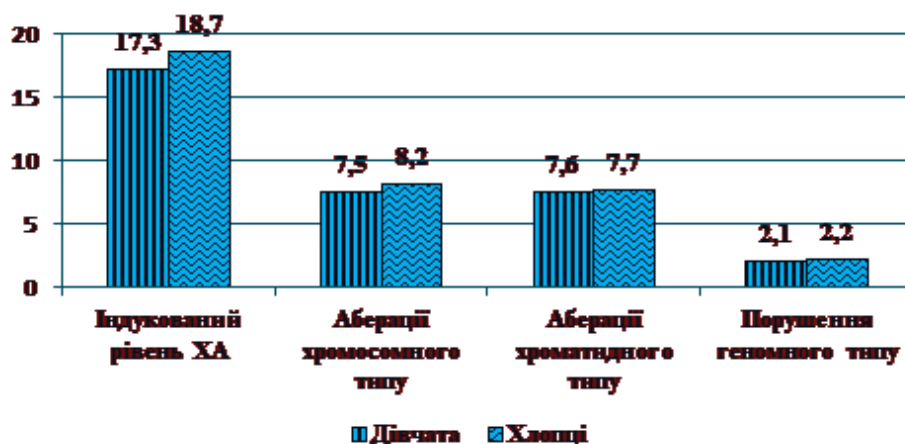
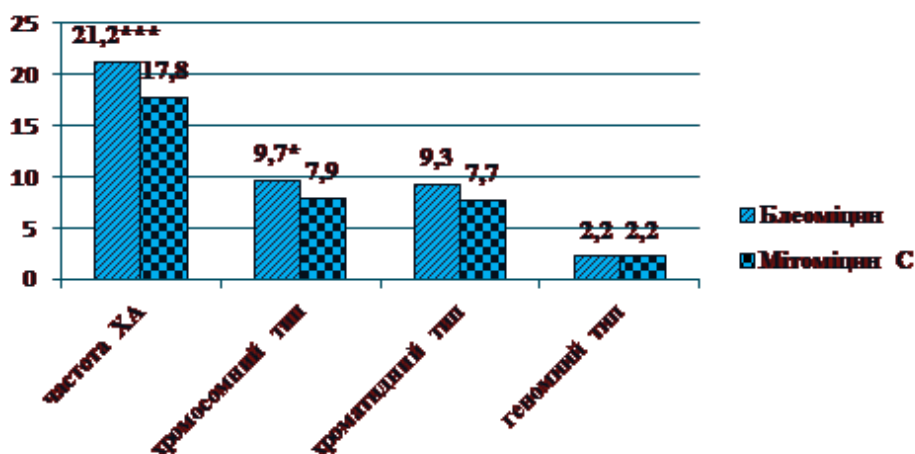


Рис. 2. Порівняння частоти хромосомних аберацій у дітей УЛНА після дії мітоміцину С на лімфоцити крові, %



Примітка. Значущі відмінності: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

Рис. 3. Порівняння частоти хромосомних аберацій у дітей УЛНА після впливу блеомицину і мітоміцину С на лімфоцити крові, %

Порівняння частоти аберацій хромосом у лімфоцитах крові після дії мутагену-провокатора блеомицину у дітей УЛНА з їх частотою у здорових однолітків свідчила про відсутність значущих відмінностей: нащадки, що народилися в сім'ях опромінених батьків та їх здорові однолітки мали

майже ідентичний загальний показник (21,2 % проти 21,5 %, $p > 0,05$). Проте, зіставлення частоти хромосомних порушень після дії мітоміцину С свідчило про вірогідне збільшення рівня в ЛПК дітей УЛНА (17,77 % проти 11,97 %, $p < 0,001$) (табл. 2).

Таблиця 2

Частота порушень хромосом в лімфоцитах крові дітей УЛНА та здорових однолітків після впливу мутагенів-провокаторів, %

Типи хромосомних порушень	Блеоміцин		Мітоміцин С	
	діти УЛНА	здорові	діти УЛНА	здорові
	n = 1761	n = 765	n = 2261	n = 2057
Хромосомного типу:	9,30	10,0	8,00	5,33
парні фрагменти	9,20	9,01	7,70 ^{***}	5,29
дицентрики	0,06	0,80	0,04	0,00
кільцева хромосома	0,20	0,10	0,18	0,04
Хроматидного типу:	9,70	9,01	7,70	6,75
одиначні фрагменти	9,40	8,9	7,60	6,75
обміни	0,20	0,10	0,04	0,00
Геномного типу:	2,21	2,47	2,19 ^{***}	0,14
поліплоїдні клітини	0,28	0,51	0,35	0,14
тотальне ушкодження хромосом	1,31	1,83	1,33 ^{***}	0,00
передчасне розходження хромосом	0,06	0,06	0,04	0,00
мультиаберантні клітини	0,56	0,58	0,49 ^{***}	0,00
Усього	21,21	21,48	17,77^{***}	11,97

Примітки: n – число проаналізованих клітин; значущість розбіжностей

*** – $p < 0,001$.

Серед аберацій хромосомного типу превалювали парні ацентричні фрагменти в ЛПК дітей УЛНА, які виникали під впливом мітоміцину С. При зіставленні реакцій хромосомного апарату лімфоцитів периферичної крові після впливу мутагену блеомицину,

виявили практично однакові значення.

Значущі відмінності встановлено в частоті порушень геномного типу (частоті тотального пошкодження хромосом та мультиаберантних клітин). Частота ушкоджень ДНК в соматичних клітинах ви-

значається рівнем мутагенного навантаження, якому піддаються клітини людини, а також ефективністю роботи систем репарації виникаючих порушень. Широко вивчено ключові сигнальні шляхи, які відіграють провідну роль у відповіді соматичних клітин людини на іонізуюче випромінювання, і в першу чергу, у відновленні пошкодженої ДНК [Васильев и Лебедев, 2018]. За даними літератури, відомо, що клітини з радіаційно індукованими хромосомними абераціями зберігаються в організмі до 40 років і довше [Соболева и др., 2013].

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що при порівнянні з контрольною групою у дітей, народжених від батьків УЛНА, виявлялася більш висока частота аберацій хромосом у культивованих лімфоцитах крові, особливо внаслідок впливу мутагену мітоміцину С. Виражена нестабільність генетичного апарату клітин ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС може розцінюватися як наслідок впливу радіації на соматичні клітини. Поява ж в каріотипі їх дітей аналогічних хромосомних аномалій з високою частотою свідчить про спадкування цієї нестабільності, що виникла під впливом радіації на гамети батьків-ліквідаторів.

ВИСНОВКИ

Зіставлення впливу мутагенів-провокаторів на ЛПК нащадків опромінених батьків свідчило про більш вагомий вплив блеомицину (21,21 %) порівняно з мутагенним впливом мітоміцину С (17,77 %) на рівень хромосомних ушкоджень. Отримані дані підтвердили реальність зміни стабільності геному соматичних клітин дітей ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС, і можливість її виявлення за допомогою тестуючого мутагенного навантаження *in vitro*.

БІБЛІОГРАФІЧНІ ПОСИЛАННЯ

Актуальные вопросы канцерогенеза / И.В. Высоцкая [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2019. – Т. 12, № 1. – С. 101-106. Doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-101-106.

Балева Л.С. Предикторы риска формирования радиационно-индуцированных стохастических заболеваний в поколениях детей из семей облученных родителей – актуальная проблема современности / Л.С. Балева, А.Е. Сипягина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т.64, № 1. – С. 7-14. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2019-64-1-7-14>.

Васильев С.А. Цитогенетические и экспрессионные маркеры индивидуальной радиочувствительности человека / С.А. Васильев, И.Н. Лебедев // Медицинская генетика. – 2018. – Т.17, №1. – С. 3-8. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2018.01.3-8>.

Воробцова И.Е. Комплексная цитогенетическая характеристика лиц, пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС / И.Е. Воробцова, А.В. Семёнов // Радиационная биология. Радиозкология. – 2006. – Т. 46, № 2. – С. 140-151.

Глазко В.И. Источники противоречий в оценке популяционно-генетических последствий Чернобыльской аварии / В.И.

Глазко, Т.Т. Глазко // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 48-64.

Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. – 2008. – № 1. – С. 58-72. <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/8044>.

Орадковская И.В. 30 лет трагедии в Чернобыле. Клинические и иммунологические эффекты у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции. Основные итоги многолетнего мониторинга // Радиационная биология. Радиозкология. – 2016. – Т. 5, № 3. – С. 251-273.

Радиационное поражение и пути восстановления репродуктивной системы самцов млекопитающих / Г.Г. Верещако [и др.]. – М.: Изд-во «Белорусская наука», 2018. – 175 с.

Соболева О.А. Хромосомные аберации и полиморфизм генов репарации ДНК у детей Кузбасса, проживающих в условиях различной мутагенной нагрузки / О.А. Соболева [и др.] // Политравма. – 2013. – Т. 5, № 6. – С. 56-60.

Delineating the Effects of Ionizing Radiation on Erythropoietic Lineage—Implications for Radiation Biodosimetry / S. Nimker [et al.] // Health Physics. – 2019. – Vol. 116, № 5. – P. 677-693. Doi: 10.1097/HP.0000000000000975.