

ГЕНЕТИКА

Отдаленные генетические последствия действия радиации и других факторов среды на человека. Проблемы действий радиационных и химических генотоксикантов среды на человека занимает ведущее место в современной генетике. Первоначально они рассматривались традиционно с точки зрения эффектов острых и хронических воздействий, а также воздействий различных их доз на живые клетки или организм в целом. Вопросы, касающиеся выяснения генетических основ проявления их действия в отдаленные периоды после воздействия, оставались без должного внимания. Относительно недавно в экспериментах на культуре клеток было обнаружено, что генетические эффекты ионизирующей радиации не ограничиваются изменениями, наблюдаемыми непосредственно после первичного контакта с ней. Установлено, что в достаточно отдаленных поколениях выживших клеток могут *de novo* возникать различные повреждения генома (1,2), отличающиеся по спектру и выраженности от результатов острых воздействий. Эти события послужили основой развития нового направления, выделяемого как «отдаленные последствия действия радиации» не только на клеточном, но и организменном уровне.

В основе таких последствий лежит феномен, объединяемый понятием «радиационно-индуцированная нестабильность генома» (РИНГ), заключающийся в повышении вероятности формирования непредсказуемых дефектов в геноме

дочерних клеток. РИНГ не является результатом структурных мутаций в ДНК, возникших под прямым влиянием радиации, и рассматривается как особое состояние генома этих клеток, характеризующееся большей подверженностью к последующим повреждениям. Отсюда возникновению отдаленных последствий, например спонтанному возникновению мутаций, репродуктивной гибели, ускорению апоптоза и др., предшествует индукция нестабильности генома. За проявления РИНГ в потомстве облученных клеток принимаются спонтанные нарушения структуры ДНК на фоне изменения ее репарации и функции окислительно-восстановительной системы (3,4). На организменном уровне обращает внимание изменение оксидативного статуса в клетках крови облученных людей, у которых с возрастом возникают новые патологии (5).

Более интенсивно исследовалась нестабильность, индуцированная радиацией – фактором, отличающимся глобальной распространенностью и высоким уровнем предполагаемой опасности. Однако сходства основных механизмов, индуцирующих мутационные преобразования структуры генетического материала предусматривают возможности возникновения аналогичных ситуаций под влиянием всех типов генетически активных загрязнителей среды.

Многие исследователи считают, что индукция РИНГ связана с действием радиации в малых дозах, за которую, в соответствии с предло-

жением НКДАР, принимается 0,2 Гр, хотя другие международные организации, например, Американский Комитет по биологическим эффектам радиации (BEIR) рекомендует 0,1 Гр. Тем не менее, А.Н. Котеров (6) утверждает, что РИНГ может индуцироваться любыми дозами любой радиации независимо от ЛПЭ, за исключением участвующего в инициации канцерогенезе. По его же мнению, для учета индукции РИНГ в экспериментах *in vitro* должны использоваться нормальные клетки – лимфоциты, фибробласты, клетки эпителия, уротелия, гемопоэтические. А иммортализованные, трансформированные или опухолевые клетки, а также клетки с дефектами в системе репарации ДНК, например, от больных синдромом Блума, Фанкони, ломкой Неймегена и др., заведомо обладают значительной спонтанной нестабильностью генома.

В возникновении РИНГ участвуют нарушения как структурного, так динамического составляющего стабильности генома. Структурную компоненту определяют, естественно, первичная, вторичная, третичная структуры ДНК и ее комплексов с белками в пределах генома. Динамическая компонента включает весь процесс экспрессии генов с использованием комплекса регуляторных программ. Тем не менее, точные механизмы индуцированной нестабильности генома пока не установлены. В.К. Мазурик и др. (6-10) считают, что в возникновении, по крайней мере, радиационно-индуцированной нестабильности генома ведущую роль играют динамические факторы. По их мнению, ионизирующая радиация нарушает три взаимосвязанные системы, обеспечивающие: а) окислительно-восстановительный гомеостаз; б) контроль клеточного цикла в сверхочных точках (check-points); в) механизмы репарации.

В первом случае повышается продукция активного кислорода, который повреждает клеточные компоненты, особенно ДНК, и приводит, тем самым, к увеличению частоты клеточной гибели, различным мутациям и абберациям хромосом. Во втором – могут индуцироваться множественные мутации в гене p53, и повышаться экспрессия белка p53 с утраченной эффективностью контроля над другими генами (p21, bcl2, bax), участвующими в надзоре за клеточным циклом и за элиминацией поврежденных клеток путем апоптоза. В итоге часть клеток с мутациями

могут сохраняться в потомстве и поддерживать нестабильность генома. В третьем – под влиянием радиации могут происходить как нерепарируемые и частично репарируемые повреждения, так и нарушения самих механизмов репарации. Эти обстоятельства также приводят к поддержанию нестабильности генома.

С механизмом РИНГ связывают также передачу конформационных перестроек хроматина, связанных с ядерным матриксом, и молчащих генов, переходящих в активное состояние после метилирования CpG динуклеотидов в промоторной части гена. Таким образом, в формировании индуцированной нестабильности генома участвует и эпигенетическая передача измененной модели генной экспрессии в последующие поколения.

Проявления отдаленных последствий действия радиации в культурах клеток фиксируются как по морфологическим, так и функциональным показателям. Иными словами, происходит не только повышение частоты *de novo* возникающих мутаций, но и изменение радиочувствительности клеток и экспрессии отдельных генов, исчезновение адаптивного ответа, усиление апоптоза, отсроченной репродуктивной гибели и других процессов. Следует заметить, что увеличиваются, в основном, различного рода точковые и генные мутации (hprt, tk, p53, резистентность к уабаину, мутации в минисателлитных областях, а также генах, контролирующих репродуктивную функцию клеток и др.), а крупные мутации типа делеций являются результатом непосредственного повреждения ДНК (11,12,13).

Выявляемые хромосомные повреждения случайны и непредсказуемы как по частоте, так и по выраженности. Тем не менее, некоторые типы аббераций, например, хроматидные разрывы, фрагменты и малые хромосомы оказываются более подверженными передаче в поколениях. Возможно, поэтому спектр мутаций в дочерних клетках оказывается ближе к спонтанному, чем радиационно-индуцированному. Отсроченная репродуктивная гибель клеток, т.е. индукция *de novo* летальных мутаций в отдаленных потомствах облученных клеток, выражается в виде абортных колоний и колоний с гигантскими клетками. Они отличаются сниженной клоногенной активностью. Отсроченную репродуктивную гибель клеток могут индуцировать пролонгиро-

ванное действие ионизирующей радиации в возрастающих дозах, а также некоторые химические ДНК-повреждающие факторы – этилметансульфонат, эндонуклеазы HinfI, вызывающие односторонние разрывы ДНК (14).

Первые сообщения об отдаленных последствиях действия радиации на человека появились еще в конце 20-х годов прошлого столетия, когда J.Murphy (15) и H.Mauger (16) обнаружили некоторое повышение количества уродств развития в потомствах женщин, проходивших курс радиотерапевтического лечения заболеваний органов малого таза. Позже в аналогичных условиях стали наблюдать учащения мертворождений, постнатальной гибели и спонтанных аборт. J.Musil, J.Pavlova (17) подобные нарушения нашли в потомствах женщин, облучавшихся по поводу туберкулеза, а S.Macht и P.Laurence (18) – в потомстве мужчин радиологов. В последующем происходило дальнейшее накопление сходных данных. С годами повышался интерес к изучению природы этих явлений, поскольку резко возрастало число людей, подвергающихся воздействию негативных факторов среды. Общеизвестно, что в прошлом столетии повсеместно активизировались испытания ядерного оружия, расширилось использование радиации и химиопрепаратов для диагностики и лечения различных заболеваний, увеличивался контингент рабочих, профессиональная деятельность которых была связана с ежедневным контактом с радиационными и химическими мутагенами. Более того, имели место крупные аварии на атомных электростанциях и атомных подводных лодках, осваивался космос и сверхскоростные самолеты.

Постепенно крепло предположение, что негативные факторы среды способны вызывать генетические эффекты, проявляемые также и в потомстве. В этой связи возникла потребность в прямых доказательствах, в первую очередь, индукции мутаций в половых клетках человека, а затем и передачи потомству их следствий в виде определенных «сигналов готовности» к тем или иным генетическим изменениям. Однако существуют определенные трудности в изучении данной проблемы, связанные с тем, что человек не подлежит экспериментальному воздействию каких-либо факторов среды его обитания, причем с заданными параметрами доз, позволяющими исходить из ожидаемых эффектов. Поэтому пер-

воначально доказательства индукции мутаций в половых клетках и передачи их потомству строились из данных экспериментов на мышах, в которых анализировались генетические и соматические отклонения от контроля первого и ряда последующих поколений самок и самцов, подвергавшихся экспериментальному воздействию радиации (19,20,21). Было обнаружено, что в первом поколении увеличиваются уродства развития, мертворождения и постнатальные гибели, указывающие на нарушения ранней стадии развития. В дальнейших поколениях отмечены: достоверное снижение репродуктивной способности, связанное с появлением стерильных и полустерильных особей; различные врожденные дефекты; морфологические, биохимические и функциональные отклонения от нормы в отдельных органах и системах организма. В опытах на грызунах такие отклонения можно было обнаруживать до 30-40 и даже до 70-80 поколений (22).

Уже эти данные указывали на возможность перехода генетических повреждений половых клеток родителей в соматические клетки потомства. Прямым доказательством такого перехода могли служить четкие различия по какому-либо определенному признаку в потомствах родителей, подвергавшихся и не подвергавшихся действию генотоксикантов. Vorobtsova I.E. (1988) представила эти доказательства, показав, что канцерогенный агент – уретан достоверно повышает частоту аденом легких в потомстве облученных самцов мышей. С.И.Заичкина и др. (4) связь РИНГ с родителями показали с помощью теста «адаптивный ответ». Они нашли, что у потомства самцов мышей, подвергавшихся хроническому действию γ – излучения в малых дозах, появляется повышенная радиорезистентность и отсутствует радиоадаптивный ответ в условиях воздействия радиацией по стандартной схеме (0,1 + 1,5 Гр). Л.Н.Николаевич и А.П.Амвросьев (25) изучили цитогенетические эффекты в соматических клетках (фибробластах) 20-суточных плодов и новорожденных крысят после воздействия γ -излучением в период их антенатального развития. Они обнаружили различия в частоте и спектре типов аберраций в клетках облученных зародышей. Эти нарушения сохранялись и после рождения крысят, выявлялись еще и у плодов второго поколения. Используя подобного или другого рода приемы, трансзиготное

наследование генетических эффектов радиации наблюдали также у кроликов, морских свинок, различных грызунов.

Для доказательства такой передачи генетических эффектов γ – излучения у человека, А.М. Лягинская и др. (26) предприняли эпидемиологический анализ среди большой группы ликвидаторов Чернобыльской аварии с использованием данных отраслевого регистра. В этом регистре были фиксированы не только индивидуальные и суммарные дозы внешнего облучения облучаемых, но и такие данные, как беременность жены, самопроизвольные аборт, деторождения, половой состав детей, число ВПР среди детей. Было найдено, что у детей ликвидаторов в 2-3 раза выше рекомендованных НКДАР величин (6%) частота ВПР, в 3-4 раза выше частота самопроизвольных абортов по сравнению с группой сравнения, в 2-4 раза выше частота рождения недоношенных и больных детей. Почти половина детей рождались маловесными. При дозах внешнего облучения 10-25 сГр у ликвидаторов появлялись детерминированные эффекты – период временной стерильности, сохраняющиеся у некоторых из них до 3-х лет. Авторы по праву считают, что совокупность всех обнаруженных генетических эффектов является результатом облучения гонад ликвидаторов в процессе выполнения их профессиональной обязанности и последующей передачи их потомству.

Таким образом, условием проявления отдаленных последствий действия ДНК-тропных факторов у животных и человека, адекватным такому в клетках *in vitro*, можно принимать возникновение генетических эффектов в потомстве родителей, подвергавшихся их действию. Тем не менее, надо признать, что при сходстве терминологии, индуцированные нестабильности генома, передаваемые от клеток к клеткам *in vitro* и от родителей к потомству являются разными феноменами. В.Г.Безлепкин и А.И.Газиев (27) считают, что для первого случая допустимо определение «трансмиссибельная геномная нестабильность», в то время как для второго оно должно звучать как «трансмиссибельная нестабильность клеток полового пути» (*germline instability*). Существуют различия и по некоторым проявлениям, характерным для нестабильности генома в этих системах. Так, на организменном уровне не удастся выявить увеличения клоновой гете-

рогенности, задержку репродуктивной гибели клеток и др. Здесь преобладают повышение темпов мутирования и увеличение риска возникновения опухолевых и других патологий у потомства (Безлепкин и др., 28), а также нарушение развития человека и животных (Vorobtsova, 29).

Генетические эффекты ионизирующей радиации у потомства облученных родителей И.Е.Воробцова (30) условно делит на три типа: серьезные нарушения в развитии, увеличение риска канцерогенеза и ухудшение здоровья. Выявляемость первого из этих типов эффектов у человека весьма низка по сравнению с животными. По этому поводу она высказывала (1974 год) предположение, что выраженность генетических последствий радиации у потомства зависит от репродуктивного потенциала вида, и писала: «Человек характеризуется низкой скоростью репродукции (длительная, одноплодная беременность, продолжительное половое созревание). В этой ситуации для поддержания численности популяции эволюционно кажется выгодным, чтобы отбор против особей с серьезными наследственными нарушениями происходил на возможно более ранних стадиях развития плода с тем, чтобы неполноценная беременность прерывалась, и могло произойти новое зачатие. Известно, что в человеческой популяции существует достаточно большой груз наследственной патологии, поэтому, вероятно, дополнительно индуцированные наследственные повреждения элиминируются у человека при еще не диагностированной беременности, а к рождению допускаются преимущественно лишь особи, соответствующие «адаптивной видовой норме. В связи с этим у человека при облучении родителей не удастся обнаружить резкого увеличения частоты крупных наследственных аномалий. Они просто ускользают от наблюдения».

В дальнейшем это предположение получило не только подтверждение, но и дополнение доказательствам того, что выраженность генетических эффектов у потомства зависит еще и от типа мутаций, формируемых у них на основе полученных от родителей «сигналов». Весьма важным оказывается также связь возникновения мутаций со стадией развития плода – антенатального и постнатального. Так, летальные мутации в эмбриональных клетках реализуются в виде эмбриональной гибели с последующим выкидышем, мертворождений, ранней неонатальной

смертности, а нелетальные мутации проявляются в виде врожденных пороков, стерильности, наследственных заболеваний, ослабленного здоровья потомства.

Изучение второго типа отдаленных генетических последствий радиации, т.е. увеличение риска канцерогенеза, также имеет свою историю. Она началась с первого сообщения A.Stewart и др. (31) о повышенной частоте лейкозий у детей, рожденных облученными женщинами. Позже M.Gardner и др. (32) указали на увеличение лейкомогенного риска у детей работников ядерного предприятия в Шеллофильде. В эти годы начали активизироваться исследования на потомствах человека и животных, чьи родители до зачатия облучались экспериментально или по поводу опухолевых заболеваний, а также ликвидации Чернобыльской аварии российскими и японскими исследователями (33,34).

В последнее десятилетие окончательно сформировалось представление, что основу инициальной стадии канцерогенеза составляет феномен индуцированной нестабильности генома (35). Очевидно, что ИНГ дестабилизирует наследственный аппарат человека и его потомства, увеличивая, тем самым, вероятность мутации в любых генах, в том числе ответственных за процессы опухолевой трансформации клеток. Обсуждались и более конкретные проявления нестабильности генома, участвующего в канцерогенезе. Так, считается, что доказательством несения раковыми клетками мутаций в геномстабилизирующих генах служат микросателлитная нестабильность и нестабильность ДНК повторов транскрибируемых последовательностей. Эти нестабильности создаются изменениями их длины под влиянием радиации, они могут проскальзывать при репликации и повреждают функции различных, в том числе опухолеродных генов. Возникают: нарушения в системах репарации повреждений ДНК или ошибки при ее репликации; ослабление функций чек-пойнтов клеточного цикла, позволяя поврежденным клеткам продолжать делиться и умножать количество аномальных клеток; снижение способности к апоптозу, допуская выживание клеток с генетическими нарушениями (36, 37, 38, 39, 40). Следовательно, возникновение микросателлитной нестабильности является первым шагом в канцерогенезе. Существует ряд клинко-лабораторных подтвер-

ждений этой гипотезы. Так, обнаружены ассоциации мутаций в микросателлитных последовательностях с различными ранними проявлениями опухолей. Они найдены, например, у больных с хроническим панкреатитом и язвенным колитом еще до развития дисплазий.

Ряд других исследователей указывали на повышенный риск возникновения злокачественных опухолей у лиц с высокой частотой хромосомных aberrаций (48). Некоторые из них предлагали использовать хромосомные aberrации в качестве доклинических маркеров возникновения новообразований (49). Позже была обнаружена также повышенная частота мутаций по генам Т-клеточного рецептора в лимфоцитах периферической крови у онкобольных (50). Дальнейшая активизация исследований вопроса привела к обнаружению, что группу риска могут составлять не только лица с высокой частотой мутаций в генах, вовлекаемых в канцерогенез, но и не вовлекаемых. Удалось также определить значения избыточного относительного риска заболеваемости на единицу дозы (51). Таким образом, предвестниками радиогенных опухолей могут служить не только индукция нестабильности генома у потомства облученных родителей, но и различные хромосомные и генные мутации у взрослых.

Сообщения по третьему типу отдаленных последствий, т.е. ухудшению здоровья потомства облученных людей, начали появляться еще в 20-х годах прошлого столетия и исходили из результатов обследований детей, родители которых подвергались радиационному воздействию. В последние годы стал особенно заметным рост общей соматической заболеваемости, нервно-психической дезадаптации, тенденции к хронизации болезней, учащение случаев развития иммунодефицитных состояний у детей, как родившихся от облученных родителей (ликвидаторов Чернобыльской аварии), так и проживающих в регионе ЧАЭС, Семипалатинского ядерного полигона и Приаралье (41,42). Среди потомства облученных родителей с высоким уровнем хромосомных aberrаций в соматических клетках выявлялись наследственные заболевания и врожденные пороки (43,44,45).

Следует заметить, что изучение отдаленных последствий радиации не должны ограничиваться исследованиями клинических проявлений ге-

нетических эффектов в потомстве облученных людей. Следует широко использовать также анализ стохастических генетических нарушений в клетках потомства. И.И.Сусков и др. (59) нашли, что в культурах лимфоцитов детей, рожденных от отцов-ликвидаторов Чернобыльской аварии и проживающих на территории, не загрязненной радионуклидами, повышена частота aberrаций хромосом по сравнению с контролем. У большинства этих детей был снижен также репаративный синтез геномной ДНК, индуцированный воздействием γ и УФ-излучений. Авторы связывают эти явления с индукцией трансгенерационной нестабильности генома. В отдаленные периоды после аварии найдены существенные нарушения цитогенетического статуса в соматических клетках и подростков, проживающих в условиях хронического накопления радионуклидов (60).

Н.С.Кузьмина и И.И.Сусков предлагают судить об экспрессируемости радиационно-индуцированной нестабильности генома в соматических клетках потомства по изменению не только спектра хромосомных aberrаций, но также и радиочувствительности (70). По их данным спектр хромосомных нарушений у внутриутробно облученных детей (накопленные дозы 1–2,5сГр) был сходен с таковым у детей, рожденных после аварии, а также взрослого населения изучаемого региона. Тем не менее, в интактных лимфоцитах внутриутробно облученных детей в трех последовательных митозах происходило повышение одноразрывных хромосомных aberrаций (парных фрагментов + центромерных разрывов), но не изменялись частоты нестабильных (дигцентриков+колец) и стабильных (инверсий+транслокаций) повреждений. После воздействия на эти лейкоциты *in vitro* 10 сГр γ -излучений число aberrантных клеток и парных фрагментов+центромерных разрывов постепенно возрастало, частоты дигцентриков+колец – убывали, а инверсий+транслокаций оставались неизменными. Однако средние частоты стабильных+нестабильных aberrаций обменного типа после тестирующего облучения *in vitro* в лимфоцитах периферической крови детей, облученных внутриутробно, оказались выше, чем в контрольной группе, свидетельствуя, тем самым, о повышении у них радиочувствительности. Это мнение авторы связывают с выявленными ими закономерностями индукции геномной нестабильности в потомстве многократно поде-

лившихся клеток растущего организма при пролонгированном действии сверхмалых (1–2,5сГр) доз радиации.

И.И. Пелевина и др. (71,72) показали, что подобная ситуация, т.е. повышение радиочувствительности может возникать в отдаленные сроки после воздействия радиации в пределах и одного поколения. Они обнаружили, что среди жителей разного возраста, проживающих на территориях, загрязненных в результате аварии на ЧАЭС, доля лиц с адаптивным ответом снижена, а с радиочувствительностью после адаптирующего облучения – повышена. Эта же группа исследователей (73, 74) получила сходные данные при обследовании 85 жителей Южного Урала и утверждала, что «индивидуумы, у которых адаптирующее облучение вызывает повышение радиочувствительности, характеризуются нестабильностью генома и составляют группу риска с повышенной вероятностью появления отдаленных последствий облучения». Такими последствиями могут оказаться формирование крупных повреждений генома и последующее развитие различных форм патологий у человека.

По результатам эпидемиологических и клинических наблюдений накоплен огромный материал об отдаленном повышении различных форм заболеваемости и функциональных нарушений также и у лиц, подвергавшихся прямому воздействию генотоксических факторов и носящих поэтому различные типы мутаций. Так, обнаружено, что присутствие хромосомных aberrаций коррелирует с синдромами хронической усталости, вторичного иммунодефицита, преждевременного старения, малигнизации, а также репродуктивными дисфункциями (46,47). И.Е. Воробцова и А.В. Семенов (52, 53) у 953 пострадавших при Чернобыльской аварии нашли связь повышенного уровня хромосомных aberrаций в крови с вероятностью сердечно-сосудистой и желудочно-кишечной патологии. Аналогичное явление наблюдали также В.А.Шевченко и Г.П.Снигирева (54). В.К.Иванов и др. (55) выявили дозозависимое влияние радиации на цереброваскулярную заболеваемость. Я.В.Поровский и др. (56) описали морфофункциональные изменения в коже ликвидаторов через 10 лет после аварии на ЧАЭС. Они регистрировали пролиферативный гиперкератоз и гистопатологические признаки, свойственные иммунопатологическим реакциям.

А.Б.Карпов и др. (57) указали на устойчивую тенденцию к росту острых инфарктов миокарда среди работников Сибирского химического комбината старше 20 лет. Авторы считают, что «в патогенезе острых коронарных катастроф ионизирующие излучения выступают в качестве фактора, усугубляющего отрицательное влияние «традиционных» факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний через плеотропные эффекты». Такое взаимодействие, по-видимому, может иметь место и при многих других патологиях, например, диабете, атеросклерозе, эмфиземе легких и др.

Показателями участия генотоксических факторов в повышении заболеваемости служат не только изменения частоты хромосомных aberrаций в соматических клетках человека, но и нарушения формирования в них адаптивного ответа. Отсутствие адаптивного ответа или, напротив, выработка гиперчувствительности клеток к воздействию физических и химических факторов, даже в малых дозах, снижает защитные силы организма, способствуя, тем самым, развитию разных заболеваний (58).

Предполагается, что все эти проявления отдаленной соматической патологии также обусловлены индукцией нестабильности генома. Геном клетки с ИНГ работает не стандартно, с большим количеством сбоев, провоцируя возникновение стойких генетических изменений клеток, которые служат в последующем основой повреждений тканей и органов (53). Поэтому возникновение «спонтанных» мутаций в соматических клетках человека, подвергавшегося действию радиационных и химических генотоксикантов в прошлом, также должны рассматриваться проявлением отдаленных последствий действия этих факторов.

Основными критериями возникновения отдаленных последствий, выявляемых на клеточном уровне, являются повышение частоты отдельных типов хромосомных, генных и минисателлитных мутаций в культурах лимфоцитов периферической крови (61-67). Для отнесения хромосомных мутаций к признакам отдаленных последствий условно принимаются несоответствие их спектров индуцированным. Имеет также значение превышение ожидаемого выхода aberrаций для установленных доз или продолжительности времени.

Н.М. Слозина и др. (68) относят к проявлениям отдаленных последствий действия радиации результаты цитогенетического обследования 392 ликвидаторов аварии на ЧАЭС и 56 моряков атомного подводного флота, участвовавших в испытании ядерного оружия. Временной интервал от момента облучения до обследования в первой группе варьировал от 8 до 10, во второй – от 1 до 49 лет. Общая частота нарушений хромосом в обеих группах превышала контроль, и состояла в основном из нестабильных типов aberrаций (дицентриков и колец), а также межхромосомных и хроматидно-хромосомных обменов. По данным А.В.Севаньяева и др. (69), в те же сроки после прекращения профессионального контакта с источниками ионизирующих излучений, у работников ядерно-химического предприятия обнаруживаются достоверные повышения частот хромосомных aberrаций как нестабильного (дицентрики и центрические кольца), так и стабильного типа.

А.В.Аклеев и др. (73) нашли, что в культурах лимфоцитов хронически облученных людей повышена частота CD3-CD4+ Т-лимфоцитов, хромосомных aberrаций стабильного (транслокации) и нестабильного (дицентрики, кольца) типов. Дополнительное облучение (1Гр) с последующей 24-часовой инкубацией вызвало достоверное повышение апоптоза в клетках облученных, по сравнению с необлученными. На основании этих данных авторы предполагают, что хроническое облучение (более 50 лет) в дозах от 0,01 до 3,22 Зв вызывает повреждение генетического аппарата, проявляемое повышениями частоты изученных мутаций. Усиление апоптоза рассматривается при этом интегральным показателем повышения частоты хромосомных aberrаций и некоторых соматических мутаций и свидетельствует, что в отдаленные сроки резервы адаптации у хронически облученных людей истощаются и дополнительные воздействия вызывают ее срыв.

Другая группа исследователей (75,76,77) выявила связь между индукцией нестабильности генома и возникновением некоторых генных мутаций – гликофориновых и TCR (по генам Т-клеточного рецептора) – в соматических клетках ликвидаторов спустя 10 лет после аварии на ЧАЭС. Доля лиц с повышенным числом мутантных клеток в столь отдаленные сроки после

облучения достоверно превышала таковую в контроле. Особенно значимым был вывод применительно к TCR-мутации, отличающейся, обычно, быстрой элиминацией из организма.

Ряд исследователей считает, что адекватность оценки отдаленного генетического риска повышается в условиях исследования частоты всех типов мутаций, включая мутации в повторяющихся последовательностях ДНК, а именно минисателлитных локусах (78,79, 80, 81, 82). Эти утверждения обосновываются тем, что в геноме человека насчитывается несколько десятков тысяч минисателлитных локусов, многие из которых обладают высокой изменчивостью, связанной также и особо высокой скоростью их мутирования (83,84). Однако другие исследователи (85-92) в популяциях, подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения во время Чернобыльской аварии, не выявили существенных изменений скорости мутирования в минисателлитных локусах. Отсюда они утверждают, что «использование минисателлитных локусов при анализе индукции мутаций не позволяет в полной мере оценить генетический риск воздействия ионизирующего излучения на человека». Далее Ю.Е. Дубрава (39) обсуждает проблематичность трансгенерационной передачи мутации в минисателлитных локусах потомству и приходит к заключению, что «будущее радиационной генетики человека связано с разработкой иных экспериментальных подходов к изучению мутаций среди потомков облученных родителей». Он признает правомерным активное применение минисателлитных мутаций лишь для изучения перестроек в геноме раковых клеток.

Проблемы отдаленных генетических последствий действия на человека радиационных и химических загрязнителей среды в Казахстане. Проблема анализа генетических основ действия радиационных и химических факторов среды на жителей Казахстана не менее актуальна, чем на жителей любой другой страны. Общеизвестно, что во многих регионах Казахстана определяется постоянно действующий фон различных техногенных факторов радиационной и химической природы. Они связаны, прежде всего с многолетними испытаниями ядерного оружия на территории республики, катастрофическим омерлением Арала, широким использованием химических пестицидов в сельском хозяй-

стве и др. Таким образом, здесь имеются все условия действия на человека малых доз различных факторов среды. Следует, тем не менее, признать, что наиболее полное исследование ситуации проведено на Украине, Белоруссии и России. Правительствами этих стран были созданы крупно финансируемые, долговременные Программы по изучению последствий действия Чернобыльской аварии. Именно в этих странах возникли теперь Международные центры по данной проблеме. Они получили возможность проводить исследования не только собственными силами, но и с привлечением ученых из ведущих научных центров мира. Казахстанским же ученым пришлось довольствоваться инициативными исследованиями разрозненных групп ученых, используя случайные, весьма скромные финансы из чужих проектов (93-98).

Как указывалось выше, основными источниками неблагоприятных факторов среды, бесспорно, оставляющих отдаленный след, являются последствия многолетних испытаний на территории республики ядерного вооружения и Аральской катастрофы. Общеизвестно, что на территории Казахстана располагались и действовали несколько испытательных ядерных полигонов. Только на одном из них – Семипалатинском (СИП), за 42 года его деятельности испытаны более 450 атомных бомб, загрязнив территории Восточно-Казахстанской, Павлодарской и Карагандинской областей, площадью 304000 кв.км, и населением 1,7 млн человек (99,100). По расчетам американских ученых (101) жители обследованных нами населенных пунктов получили пожизненные кумулятивные дозы порядка 0.8-2зв. Продолжают негативно действовать на здоровье человека и оставшиеся без надзора крупные хвостохранилища ураноперерабатывающих предприятий (например, бессточное озеро Кошкар-Ата у п. Кора Мангистауской области).

До закрытия полигона изучение взаимосвязи между радиационными осадками и здоровьем населения были официально запрещены в силу строгой секретности деятельности полигона. Исследования генетических эффектов в регионе СИП ограничены по разным причинам до сих пор. Поэтому систематические и координированные изучения радиационных воздействий на жителей в соответствии с международными стандартами научно-исследовательских работ не произво-

дились. Указанные выше разрозненные исследования рассматривались как мониторинговые и должны были указывать на присутствие радиационной активности в среде обитания обследуемых людей в настоящее время и выявить среди них группы риска. При цитогенетическом обследовании 220 жителей региона СИП мы нашли значительные колебания (от 0 до 8,5%) индивидуальных частот хромосомных aberrаций (93-98). Частота выявленных нарушений у 76 человек не превышала общепопуляционного уровня (2%) для Казахстана, у 124 соответствовал повышенному (от 2 до 5%) и у 20 – высокому (от 5% и выше) уровням. В общей сложности у более половины обследованных (144 человек) частота хромосомных aberrаций превышала спонтанный уровень в 2-4 раза. Обратило, однако, внимание соотношение типов повреждений хромосом, значительную долю (около половины) aberrаций составляли хроматидные, в то же время выше возможных спонтанных величин оказывались и частоты радиационно-индуцированных («маркерных») aberrаций – дицентриков, колец и транслокаций. Аналогичные закономерности цитогенетических последовательностей найдены также у жителей п.Кора и г.Усть-Каменогорска, крупного промышленного центра, известного высокой химической загрязненностью. Эти люди подверглись также изучению радиочувствительности и формирования адаптивного ответа. Обнаружено повышение первого при отсутствии второго (102).

С точки зрения указанных выше современных представлений, обнаруженный характер распределения спектра хромосомных aberrаций, изменения радиочувствительности и адаптивного ответа у жителей регионов, находившихся под определенным грузом радиационных и химических загрязнителей в прошлом, может рассматриваться как проявление отдаленных последствий действия этих факторов у обследованных групп людей. Это предположение находит некоторое подтверждение в установленном нами характере динамики снижения хромосомных aberrаций в пролонгированных исследованиях (с 1993 по 1998 г.) жителей двух районов, Абайской и Бескарагайской Семипалатинской области (95,96). В начале наших исследований наиболее представительными были группы, носящие от 2 до 5% и от 5% и выше aberrаций хромосом. К

последнему году исследований значительно возросла численность первой группы (61%) и, напротив, заметно снизилась у групп, отличающихся повышенным (38%) и высоким (1%) показателями повреждений хромосом. Удалось показать также, что за этот период не просто снизилась частота хромосомных нарушений, но кардинально изменилось соотношение основных его типов. Так, в 1993-1995 г. частота aberrаций хромосомного типа составляла 2,9-2,2%, а хроматидного – 1,6-1,5%, соответственно двум указанным районам. К 1996-1998 г. первый показатель снизился до 1,8-0,5%, а второй остался почти на том же уровне. В результате произошло некоторое приближение к отклонениям, характерным для спонтанных генетических повреждений.

Весьма неблагоприятная обстановка сложилась и в Приаралье. Аральская катастрофа – одна из крупнейших экологических катастроф планеты – привела к необратимым процессам деградации окружающей природной среды, обратившейся трагедией для всего региона. Одной из слагающих этой трагедии считалось ожидание негативного влияния резкого обмеления моря на здоровье жителей региона. Опасение исходило из того, что с обнаженной части дна моря высвобождаются соли-пылевые частицы, содержащие опасные химические токсические вещества, которые в последующем распространяются по окружающей среде, загрязняя воздух, почву и воду.

Возникла настоятельная необходимость тщательного анализа последствий этих факторов на здоровье человека, особенно детей, являющихся особо чувствительными к любым неблагоприятным факторам среды. Лишь в 2002 г. была разработана Программа комплексного исследования проблемы по проекту МНТЦ. Из-за ограниченного размера финансирования в выполнении программы участвовала небольшая группа сотрудников из КазНМУ им.С.Д.Асфендиярова, Института ядерной физики НЯЦ, Института общей генетики и цитологии МОН РК. Программа предусматривала мониторинг загрязнителей окружающей среды (воды, воздуха, почвы) и изучения на этом фоне патологии развития, структуры заболеваемости, состояния иммунной системы и генетического статуса соматических клеток у детей, проживающих на территории, прилегающей к Аральскому морю. Всего обследо-

довано 1138 детей в возрасте от 3 до 16 лет. Обратило, прежде всего, внимание высокий процент хронической соматической патологии, носящий зачастую сочетанный характер. К факторам риска их формирования можно отнести высокие концентрации железа, йода, урана и особенно хлорорганических пестицидов в питьевой воде, включая водопроводную; существенное повышение содержания кальция, криптона, стронция, гафния и урана в почве и тяжелых микроэлементов, сульфатов и нитратов в аэрозолях. Физическое развитие детей, родившихся и проживающих в Приаралье, отличалось выраженной децелерацией, определяющейся хроническим отставанием роста и массы тела от республиканских возрастных нормативов, а также значимым изменением трофологического статуса, снижением (в 3,5 раза) темпов полового созревания. У обследованных детей в 3 раза чаще, по сравнению с детьми региона сравнения, выявляются малые аномалии развития, врожденные морфогенетические варианты развития кожи (98,6%), конечностей и суставов (77,6%). Структура заболеваемости обследованных детей характеризуется высокой частотой выявления заболеваний органов пищеварения (100%), болезней кожи (91,8%), респираторной (82,9%), мочеполовой (57,5%), сердечно-сосудистой (49,3%) и эндокринной систем. Эти величины определили и высокую степень сочетаний патологий различных органов и систем, достигая 9,4 болезней на одного ребенка. Сочетанные формы хронической патологии развивались на фоне вторичного иммунодефицитного состояния с выраженным снижением Т-клеток, уменьшением объема основных субпопуляций лимфоцитов, увеличением числа В-лимфоцитов и гиперглобулинемией IgG и IgA, существенным снижением фагоцитарного числа и повышением индекса фагоцитоза, а также значимым увеличением эндогенной продукции противовоспалительных интерлейкинов. Клиническим проявлением иммунной недостаточности у детей является инфекционный синдром (99,8%) с высоким уровнем вклада сочетанной хронической патологии.

Часть клинически обследованных детей подверглись различным цитогенетическим анализам. Обнаружено статистически достоверное повышение хромосомных aberrаций, превышающее в 2 раза аналогичные показатели в группе срав-

нения. Анализ спектра хромосомных aberrаций показал преимущественное содержание aberrаций хроматидного типа, маркеров действия химических генотоксических факторов. Они были представлены в основном одиночными фрагментами. Однако в отдельных населенных пунктах (п. Жалагаш) были установлены достаточно высокие значения aberrаций хромосомного типа (0,08% -дицентриков и 0,15%- транслокаций), которые в норме обычно не обнаруживаются. Установленная частота хромосомных aberrаций положительно коррелировала с изменениями характера репликации гена p53, а именно повышением числа SD – клеток, определяемых методом FISH и ослаблением репаративной активности клеток, выраженным снижением индукции внепланового синтеза ДНК (103, 104, 105, 106).

Таким образом, анализ результатов цитогенетических и молекулярно-генетических исследований указывает, что обнаруженные нарушения здоровья могут рассматриваться как результат индукции нестабильности генома у детей Приаралья. У большинства из них, особенно у носителей различных аномалий развития, формирование нестабильности могло произойти еще на стадии эмбриогенеза. Реальность связи повышенной заболеваемости с трансгенерационной передачей нестабильности генома у детей после Чернобыльской аварии была доказана многими исследователями (59). Надо, тем не менее, полагать, что в растущем организме детей можно, в определенной степени, регулировать переход нестабильности генома в стабильные отдаленные последствия. Для этого необходимо своевременное проведение курса реабилитационных мероприятий. В этой связи весьма важно, чтобы каждый ребенок периодически проходил обязательный цикл абсолютно полного клинического обследования. В противном случае, возникшие в детстве относительно легкие проявления влияния средовых факторов могут перерасти в более крупные или стойкие. Мы уверены в том, что оздоровительные меры должны проводиться для детей экологически неблагоприятных регионов даже при отсутствии выраженных клинических проявлений, так как они важны для охраны здоровья поколения.

Выводы и рекомендации. Известно, что загрязнения среды обитания человека генотоксикантами начались достаточно давно. Прошли

несколько десятилетий со времени активного производства и испытания ядерного оружия, крупных аварий на атомных электростанциях и атомных подводных лодках, освоения космоса, интенсивного развития крупной промышленности и авиации, а также некоторых природных катаклизмов (например, Аральская катастрофа). Вредные отходы их деятельности оказывают не только прямое влияние на здоровье человека и его потомство, но и через загрязненные природные экосистемы, оказывающиеся значимыми источниками внешнего и внутреннего воздействия. Специальный анализ результатов сравнительного изучения дозовых нагрузок на биоту и человека после аварии на Чернобыльской атомной электростанции показал, что ущерб от всех факторов аварии для человека больше, чем для объектов окружающей среды (107). Такое же положение складывается и в условиях действия различных химических загрязнителей среды (тяжелых металлов, гербицидов, пестицидов др.).

За прошедшее время досконально изучены последствия действия острых и хронических воздействий этих факторов. Однако в последнее десятилетие особое внимание стал привлекать рост уровней заболеваемости и различных нарушений жизнедеятельности среди потомства людей, подвергавшихся прямому действию генотоксических факторов или проживавших в условиях загрязненной среды. Предполагалось, что основу этой ситуации составляют генетические изменения в организме родителей и передача их потомству.

Фундаментальный анализ вопроса стал возможным лишь после возникновения нового направления исследований действия ДНК-тропных агентов, связанного с проявлением последствий генетических их эффектов в потомстве экспонированных родителей, или у взрослых по истечении достаточно длительного времени после первого взаимодействия с ними. Последствия действия обсуждаемых факторов на потомства выражаются в виде серьезных нарушений развития, увеличения риска канцерогенеза и ухудшения здоровья. Такие эффекты могут иметь место и у человека, имевшего непосредственный контакт с генотоксикантами в прошлом. К отдаленным последствиям относятся также некоторые цитогенетические или молекулярно-генетические на-

рушения, обнаруживаемые *de novo* в клетках людей, облученных давно, или в клетках его потомства. Доказано, что в основе механизмов, ответственных за проявления всех этих типов отдаленных последствий действия радиационных и химических факторов, лежит феномен индукции нестабильности генома. В зависимости от уровня проявления отдаленных последствий (организменном или клеточном), биомаркерами нестабильности генома могут служить различные непредсказуемые изменения структуры и функции отдельных звеньев ДНК.

Таким образом, фундаментальные исследования природы отдаленных последствий действия генетически активных факторов среды способствовали открытию двух феноменов в генетике человека:

- трансгенерационной передачи мутаций, индуцированных в половых клетках родителей соматическим клеткам потомства;
- индукции нестабильности генома.

Для изучения проблем отдаленных последствий действия средовых факторов в последние годы стали привлекаться также методы молекулярной эпидемиологии, нового научного направления, опирающегося на выявлении биомаркеров: внутренней дозы, эффективной дозы, предклинических биологических эффектов и восприимчивости. Использование таких биомаркеров в молекулярной эпидемиологии оказались особо результативными в онкологии (10).

Помимо столь серьезных теоретических интересов, накопленные к настоящему времени данные по изучению отдаленных последствий действия генотоксических загрязнителей среды имеют еще определенное прикладное значение. Они требуют пересмотра подходов к оценке их генетического и соматического риска не только для людей, непосредственно подвергавшихся острому или хроническому воздействию, но и их потомству. Они должны служить также основой диагностики патологий, проявляемых в отдаленные сроки после воздействия генотоксических факторов и способствовать при необходимости оказанию адресной помощи. Так, для доклинической диагностики экапатологии и выделения группы повышенного риска среди детей, по нашим данным, можно использовать клинимо-морфологические особенности множественной хронической патологии, синдром вторичного имму-

нодефицита и различные врожденные аномалии развития. А.Е.Сипягина и др. (108) рекомендуют – маркеры радиочувствительности организма к экологически неблагоприятным факторам. Предвестниками формирования различных хронических соматических заболеваний, включая рак и врожденные пороки развития у взрослых, принимаются мутации в соматических клетках, которые влекут за собой дестабилизацию генома с последующим снижением защитных свойств организма. Отсюда следует необходимость внедрения в практику клинико-эпидемиологических наблюдений в республике обязательной программы широкого мониторинга здоровья детского и взрослого населения с включением, хотя бы в отдельных случаях, и генетического мониторинга.

Список использованных источников:

1. *Mothersill C., Seymour C.B.* // *Radiat. Res.*, 1998, 149, P.256-262.
2. *Mothersill C., Seymour C.B.* // In “The effects of low and very low doses of ionizing radiation on human health”. Paris, 2000, P.59-63.
3. *Бурлакова Е.Б., Михайлов В.Ф., Мазурик В.К.* // Радиационная биология. Радиоэкология, 2001, 41, 5, С. 489-499.
4. *Михайлов В.Ф., Мазурик В.К., Бурлакова Е.Б. и др.* // Радиационная биология. Радиоэкология, 2005, 45, 5, С.561-571.
5. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф., Ушенкова Л.Н. и др.* // Радиационная биология. Радиоэкология, 2006, 46, 4, С.393-410.
6. *Котеров А.Н.* // Радиационная биология. Радиоэкология, 2006, 46, 5, С.563-575.
7. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф.* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001, 41, 3, С. 272-289.
8. *Мазурик В.К., Мороз Б.Б.* // Патология, физиология и экспериментальная терапия, 2003, 1, С.11-18.
9. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф., Ушенкова Л.Н.* // Радиационная биология. Радиоэкология., 2003, 43, 6, С.683-692.
10. *Мазурик В.К., Михайлов В.Ф.* // Радиационная биология. Радиоэкология, 2004, 44, 3, С.296-312.
11. *Little J.B., Gorgojo L., Vetrovs H.* // *Int. J. Radiat. Biol. Phys.*, 1990, 19, 6, P. 1425-1429.
12. *Little J.B.* // *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, 74, 6, P. 663-671.
13. *Jeffreys A.J., Bois P., Buard J. et al.* // *Electrophoresis*. 1997, 18, 9. P. 1501-1511.