

УДК 575:599:539.1.047

О. Г. ЧЕРЕДНИЧЕНКО, Н. Б. АХМАТУЛЛИНА, С. Б. ИСМАИЛОВ

## ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ХРОНИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА ЖИТЕЛЕЙ ПОС. КОРА МАНГИСТАУСКОЙ ОБЛАСТИ

(Институт общей генетики и цитологии МОН РК)

*Проведена оценка in vivo эффектов хронического влияния генотоксикантов на жителей пос. Кора Мангистауской области. Изучены частота хромосомных aberrаций, а также радиорезистентность и способность лимфоцитов периферической крови к формированию адаптивного ответа. Выявлены значительное повышение частоты хромосомных aberrаций как хромосомного, так и хроматидного типов у обследованной группы по сравнению с контролем, а также отсутствие реакции адаптивного ответа у лиц, проживающих в экологически неблагоприятном регионе.*

В настоящее время вследствие масштабы воздействия на экологию региона основной упор исследователей делается на изучение последствий деятельности Семипалатинского испытательного полигона [1–3]. Гораздо меньше внимания уделяется радиэкологии районов функционирования уранодобывающей промышленности. Примером, показывающим масштаб проблемы, может служить хвостохранилище Кошкар-Ата, которое представляет собой бессточное озеро-отстойник в 5 км к северу от г. Актау. В хвостохранилище с 1965 г. до настоящего времени хранятся промышленные отходы химико-горно-металлургического завода по переработке урановых руд. В последнее время ввиду экономических трудностей часть предприятий, жидкими стоками которых хвостохранилище постоянно пополнялось, остановлена. Баланс между объемами вод, поступающих в хвостохранилище, и испаряемой поверхностью нарушен. В результате этого в настоящее время озеро мелеет, обнажая донные отложения, представленные отходами переработки фосфатного и уранового сырья. Общая площадь обнаженной части хранилища составляет около 11 км<sup>2</sup> [4, 5]. Вблизи хвостохранилища, на береговой полосе, расположен пос. Кора, жители которого находятся в зоне воздействия вредных факторов хвостохранилища. В связи с этим мы провели обследование 31 жителя данного поселка для оценки частоты хромосомных aberrаций, а также радиочувствительности и способности к формированию адаптивного ответа у лиц, подвергающихся хроническому воздействию генотоксикантов при их проживании в этом экологически неблагоприятном регионе.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Образцы крови.* Образцы периферической крови от 31 человека, которые согласно проведенному анкетированию постоянно проживают в пос. Кора Мангистауской области, отбирали в стерильных условиях из локтевой вены в гепаринизированные флаконы.

*Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов.* 0,5 мл периферической крови добавляли к 4,5 мл среды культивирования, состоящей из 80% среды НАМs с глутамином (2мМ), 20% сыворотки КРС, пенициллина 100 ед./мл, стрептомицина 100 ед./мл. Деление лимфоцитов стимулировали 2% ФГА. Клетки инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Для накопления метафазных пластинок в культуральную среду за 2 ч до фиксации вводили колхицин в конечной концентрации 0,8 мкг/мл. Для получения цитологических препаратов клетки гипотонизировали 0,075М КСl при 37 °С 15 мин, фиксировали смесью метиловый спирт/ледяная уксусная кислота (3/1) и окрашивали 4% раствором красителя Гимза [6]. При анализе метафазных пластинок определяли число клеток с aberrациями, а также число и тип aberrаций на 100 проанализированных метафаз. Полученные данные обрабатывали статистическими методами [7].

*Радиационная обработка образцов крови (γ-излучение).* Цельную кровь в стеклянных флаконах облучали γ-квантами на линейном электронном ускорителе ЭЛУ-2 с радионуклидным источником <sup>60</sup>Со с номинальной энергией ускоренных электронов 2 МэВ и мощностью доз 0,01 Гр – 50 сГр/мин и 2 Гр – 100 сГр/мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследований необходимо было изучить спонтанный уровень частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови жителей пос. Кора Мангистауской области. Результаты показали, что частота клеток с хромосомными нарушениями в обследованной группе людей составила  $6,1 \pm 0,33\%$ , ( $p < 0,01$ ), что выше в 3 раза, чем у жителей г. Алматы –  $1,86 \pm 0,5\%$ , и в 7 раз, чем у жителей экологически чистого горного пос. Таусугур Алматинской области,  $0,87 \pm 0,1\%$ . Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови составила  $6,63 \pm 0,35\%$ , т.е. в отдельных случаях в клетке наблюдалось более одной aberrации. У разных лиц из пос. Кора этот показатель варьировал в значительных пределах – от 1 до 17%, при этом более 65% обследованных людей имели более 5% клеток с цитогенетическими нарушениями. Изучение спектра хромосомных aberrаций показало, что встречались aberrации как хромосомного –  $2,33 \pm 0,24\%$ , так и хроматидного типов –  $4,35 \pm 0,27\%$ . Первые – индикаторы радиационного загрязнения, были представлены двойными разрывами и фрагментами, а также дицентриками, кольцами и транслокациями. Вторые – свидетели химического загрязнения, являлись одиночными разрывами или фрагментами.

Далее мы обсудили полученные результаты с учетом данных физико-химического анализа исследуемой территории хвостохранилища, проведенного Институтом ядерной физики в 1999 г. Ими было показано, что на обмелевшей части озера мощность экспозиционной дозы (МЭД) составляет 80–150 мкР/ч, на отдельных участках этот показатель достигает 1500 мкР/ч. Помимо этого в донных отложениях выявлены повышенные концентрации таких химически токсичных микроэлементов, как марганец, никель, медь и др. [4, 5]. Отсюда понятен рост у жителей пос. Кора нарушений как хромосомного, так и хроматидного типов. Негативный эффект оказало высокое содержание не только радионуклидов, но и химических генотоксикантов в обнаженных донных отложениях хвостохранилища Кошкар-Ата.

В настоящее время негативное влияние средовых факторов в подавляющем большинстве случаев оценивается лишь по частоте различных цитогенетических показателей. Однако эти ис-

следования не дают объективной оценки генотоксической опасности хронического воздействия мутагенов различной природы. Так, в ряде работ было показано, что в лимфоцитах людей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях, не отмечалось повышенной частоты клеток с микроядрами по сравнению с контрольными группами. Однако радиоадаптивный ответ в лимфоцитах экспонированной группы был снижен, и даже наблюдалась радиосенсибилизация, которая не встречалась в контрольной группе [8]. Следовательно эффекты действия радиации в низких дозах подчас трудно определимы, но при совместном действии с аналогичными или другими агентами могут наглядно проявлять свое негативное влияние или становиться более опасными и выражаться в усилении или подавлении многих реакций, таких, как радиочувствительность, нестабильность генома, экспрессия генов, что приводит к индукции целого ряда синтезов, активации ферментов и т.д. [9], и, как было отмечено, адаптивному ответу.

Исследование реакции адаптивного ответа представлено очень широко. Однако довольно сложна и неоднозначна ситуация с изучением этой реакции у людей, проживающих в экологически неблагоприятных регионах. Существует предположение о том, что феномен адаптивного ответа является генетически детерминированным, т.е. клетки и организмы в процессе эволюции выработали универсальный механизм защиты от экстремальных воздействий и его отсутствие указывает на определенные нарушения в геноме [10]. Данные о выраженности адаптивного ответа в популяциях, подвергавшихся действию ионизирующей радиации, немногочисленны и противоречивы. Так, имеются сведения об отсутствии реакции адаптивного ответа или снижении доли населения с выраженной реакцией адаптивного ответа, проживающего на территориях с радиоактивным загрязнением в результате аварии на ЧАЭС [11, 12], между тем опубликованы данные об отсутствии связи между этими факторами [13, 14].

В связи с этим мы предполагали, что хроническое воздействие генотоксикантов, постоянно воздействующих на организм при условии проживания населения в экологически неблагоприятных регионах, может влиять на радиочувстви-

Вариант	Без облучения	Облучение повреждающей дозой 2Гр	Облучение 0,05Гр +2Гр (через 4 ч)
Тип нарушений			
Клеток с абберациями	6,1±0,33	26,1±1,0	27,9±1,0
Всего аббераций	6,63±0,35	30,9±1,0	34,4±1,0
Хромосомного типа	2,33±0,24	15,8±0,8	16,9±0,8
Хроматидного типа	4,35±0,27	15,0±0,8	17,5±0,8

тельность и формирование адаптивного ответа (см. табл.).

Изучение этих показателей у 10 человек из обследованной группы показало, что они имеют радиочувствительность на уровне контрольной группы, т.е. обнаруживается примерно 20–26% клеток с хромосомными абберациями при облучении лимфоцитов периферической крови дозой 2 Гр  $\gamma$ -излучения, что означает отсутствие состояния защищенности у этих людей к воздействию повреждающих доз радиации. Более того, индукция адаптивного ответа *in vitro* по обычной схеме (облучение клеток крови адаптивной дозой 0,01 Гр с 4-часовым интервалом повреждающей дозой 2 Гр) показало, что ни у кого из обследованных жителей достоверной реакции адаптивного ответа не формировалось.

Изучена частота цитогенетических нарушений, радиочувствительности и формирования адаптивного ответа в лимфоцитах жителей пос. Кора Мангистауской области.

В результате исследования проведена оценка эффектов хронического воздействия генотоксикантов на жителей экологически неблагоприятного пос. Кора Мангистауской области по критериям спонтанного уровня хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови, радиорезистентности и адаптивного ответа. Установлено значительное повышение спонтанного уровня частоты хромосомных аббераций, уже указывающее на снижение/нарушение защитных механизмов вследствие хронического воздействия различного типа генотоксикантов окружающей среды, что и было подтверждено в прямых экспериментах отсутствием радиорезистентности к  $\gamma$ -облучению в больших дозах и неспособностью клеток формировать адаптивный ответ.

Таким образом, полнота и объективность оценки действия генотоксичности среды могут быть достигнуты при внедрении в анализ ситуации более широкого спектра генетических эффектов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абильдинова Ж.К., Кулешов Н.П., Святова Г.С. Показатели нестабильности хромосомного аппарата у населения, пострадавшего в результате ядерных взрывов на Семипалатинском полигоне // Генетика. 2003. № 8. С. 1123-1127.
2. Саломаа С., Линдхольм К., Танкиманова М. и др. Ретроспективная FISH-биодозиметрия в популяции людей, проживающих в районе Семипалатинского полигона // Медико-социальные последствия облучения населения Казахстана в результате испытаний ядерного оружия. Семипалатинск, 2002. С.226.
3. Святова Г.С. Медико-генетические последствия многолетних ядерных испытаний на Семипалатинском полигоне: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2000. 48 с.
4. Kadyrzhanov K.K., Lukashenko S.N. Radioecological problems in Kazakhstan // Proceeding Institute of Nuclear Physics Of the National Nuclear Center of Republic of Kazakhstan, 2002.
5. Kadyrzhanov K.K., Lukashenko S.N. Radioecological aspects of Kazakhstan development – I. Eurasia conference on nuclear science and its application, 23-27 October 2000. Izmir, Turkey. P. 75-77.
6. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J. e. a. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // Experimental Cell Research. 1960. V. 20. P. 613-616.
7. Плехинский Н.А. Алгоритмы в биометрии. М., 1967. С. 82.
8. Пелевина И.И., Афанасьев Г.Г., Алещенко А.В. и др. Адаптивный ответ у человека, его распространенность, влияние генетических и экологических факторов // Тез. международ. конф. «Проблемы радиационной генетики на рубеже веков». М., 2000. С. 177.
9. Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антощина М.М. и др. Реакция популяции клеток на облучение в малых дозах // Радиаци. биология. Радиоэкология. 2003. №2. С.161-166.
10. Bosi A., Olivieri G. Variability of adaptive response to ionising radiation in human // Mutat. Res. 1989. V. 211. P. 3-17.
11. Пелевина И.И., Николаев В.А., Готлиб В.Я. и др. Адаптивная реакция лимфоцитов крови людей, подвергшихся хроническому воздействию радиации в малых дозах // Радиаци. биол. Радиоэкол. 1994. №6. С. 805-817.
12. Рябченко Н.И., Антощина М.М., Насонова В.А., Фесенко Е.В. Цитогенетический анализ адаптивного ответа у лимфоцитов доноров, проживающих на территориях с различным уровнем радиоактивного загрязнения // Радиаци. биол. Радиоэкол. 1995. №5. С. 670-675.
13. Унжаков С.В., Васильева И.М., Меликсетова И.А. и др. Адаптивный ответ, формирующийся в лимфоцитах детей, подвергшихся действию малых доз радиации в результате Чернобыльской аварии // Радиаци. биол. Радиоэкология. 1994. Т. 34, № 6. С. 827-831.

14. Васильева И.М., Унжаков С.В., Меликсетова И.А. и др. Адаптивный ответ в лимфоцитах детей из зоны с повышенным фоном ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиационная экология. 1995. Т.35, № 5. С. 662-664.

#### **Резюме**

Маңғыстау облысы Қора ауылының тұрғындарына генотоксиканттардың созылмалы әсерінің *in vivo* эффектісін бағалау жүргізілді. Хромосомалық абберациялар жиілігі, сонымен қатар оның радиорезистенттілігі мен перифериялық қанның лимфоциттерінің адаптивтік жауап түзудегі қабілеттігі зерттелді. Бақылау тобымен салыстырғанда негізгі топта хромосомалық және хроматидтік абберациялардың түрлерінің жиілігі шамалы жоғары екендігі анықталды. Сонымен қатар экологиялық жағдайы нашар аймақ-

тың тұрғындарында адаптивтік жауаптың жоқ екендігі байқалған.

#### **Summary**

Estimation of effects of chronic influence of genotoxic agents on inhabitants living in Kora settlement of Mangistau region is carried out. The frequency of chromosomal aberrations, radioresistance and ability of lymphocytes of peripheral blood to adaptive response forming are studied. It was revealed the significant increasing of chromosomal aberrations frequency (both chromosome and chromatid types) in investigated group in comparison with control, and adaptive response reaction absence in individuals who is living in ecological unfavorable region.