

Г. М. БАЙГУШИКОВА¹, Р. Б. ИСАЕВА², Н. Б. АХМАТУЛЛИНА¹

ИЗУЧЕНИЕ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА ХРОМОСОМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ У ДЕТЕЙ ПРИАРАЛЬЯ

(Институт общей генетики и цитологии МОН РК¹,
Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова²)

Изучены частота и спектр хромосомных нарушений у детей, проживающих в регионе Приаралья. Установлено, что у детей, проживающих в зонах максимального экологического риска (II зона), частота хромосомных aberrаций достоверно выше не только по сравнению с контрольной группой, но и группой детей, проживающих в зоне чрезвычайно экологического риска (I зона).

Казахстан относится к наиболее неблагополучным в экологическом отношении странам, что определяется как высокой техногенной нагрузкой природопользования на экосистемы республики, так и ситуациями, сложившимися в результате экологических катастроф (события в Аре-ле, многолетние испытания ядерного вооружения на СИП).

Клинические исследования показателей здоровья населения Приаралья начаты в 1993 г. с обследования детей, более уязвимых к действиям экзогенных факторов. Обследования проводились сотрудниками Национального медицинского университета и Национального детского реабилитационного центра «Урпак». Они же совместно со шведскими учеными в 1996 г. предприняли первую попытку выявить влияние экологии Приаралья на организм детей. Было изучено содержание свинца, марганца, кадмия в крови и волосах 12 детей [1–3]. В крови у этих детей

обнаружено чрезвычайно высокое содержание пестицидов, а содержание свинца оказалось выше, чем у детей Швеции, в 5 раз, марганца – в 6,2 раза и алюминия – в 1,7 раза. В волосах детей Приаралья содержание свинца было выше в 5,5 раза, а кадмия – в 2,5 раза.

Дети региона СИП подобного рода обследованиям не подвергались. Однако эти данные не могли отразить весь спектр возможных эффектов загрязнителей изучаемого региона на человека. Особого учета требуют прямые доказательства влияния на детей генотоксикантов среди определением степени повреждений хромосом, по крайней мере, в соматических клетках обследуемых детей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовали детей и подростков, постоянно проживающих в регионе Приаралья. Кровь (1–3 мл)

отбирали из локтевой вены обследуемых лиц, помещали в стерильные пробирки, содержащие раствор гепарина (200 ЕД/мл крови), и транспортировали в лабораторию, где проводили культивирование лимфоцитов, приготовление препаратов хромосом и их анализ при стандартной окраске (по Гимза) хромосом [4]. Состав культуральной среды: 0,5 мл цельной крови; 4,5 мл среды RPMI-1640 с добавлением L-глютамина; 1,5 мл сыворотки крупного рогатого скота; 0,1 мл раствора антибиотиков (стрептомицин и пенициллин); 0,08 мл фитогемагглютинина (Sigma, Германия). Флаконы помещали в термостат при 37°C для инкубации клеток в течение 48 ч. Для блокирования митоза на стадии метафазы за 2 ч до окончания инкубации во флаконы добавляли раствор колхицина в конечной концентрации 0,1 мл.

После окончания культивирования культуру клеток центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин для осаждения клеток. Надосадочную жидкость удаляли с помощью пипеток Пастера, добавляли предварительно нагретый до 37°C гипотонический раствор (0,75 моль/мл KCl) и ресуспендировали в нем осадок. Далее пробирки с культурой клеток выдерживали на водяной бане (37°C) 10 мин. По окончании гипотонизации вновь центрифугировали при тех же условиях с последующим удалением надосадочной жидкости.

В целях фиксации клеток осадок ресуспендировали в 1–1,5 мл свежеприготовленного фиксатора (смесь метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в пропорции 3 : 1) и доводили его объем до 5 мл. Смену фиксатора с последующим центрифугированием проводили трижды.

Препараты готовили непосредственно после окончания фиксации. Суспензию клеток раскачивали на смоченные дистиллированной водой, предварительно охлажденные предметные стекла. После высыхания препараты хромосом окрашивались по методу Гимза в течение 10 мин. Цитогенетический анализ проводили на световом микроскопе под иммерсией при увеличении $\times 1000$.

Анализировали все виды аберраций хромосом. Из аберраций хромосомного типа – ацентрические фрагменты (парные и точковые), центрические кольца и дицентрики. Из аберраций хроматидного типа учитывали ацентрические фрагменты (одиночные фрагменты) и обменные aber-

рации (в целом). Для выявления различий между группами использовали общепринятый параметрический критерий Стьюдента. Значение $p < 0,05$ считалось надежной границей статистической значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частота и спектр хромосомных и хроматидных аберраций в лимфоцитах периферической крови человека к настоящему времени принятами основными показателями состояния стабильности генома и широко используются в мониторинговых исследованиях действий любых неблагоприятных экологических факторов, обладающих потенциальной мутагенной активностью. В данной работе хромосомный анализ предусматривал изучение возможных изменений частоты и спектра хромосомных и хроматидных аберраций у детей Приаралья и зависимости этих изменений от возраста и конкретных мест проживания, т.е. населенных пунктов, находящихся на различном удалении от Аральского моря и Постановлением Правительства Казахстана от 18.01.1992 г., отнесенных к трем зонам: I – чрезвычайного экологического риска, II – максимального экологического риска, III – минимального экологического риска. В качестве зоны сравнения (IV) взят пос. Алатау Алматинской области. Обследовано 86 детей из II, III, I, и IV зон по 19, 43, 24 и 22 ребенку соответственно.

В соответствии с полученными данными средняя групповая частота хромосомных нарушений составила: II – $1,84 \pm 0,13\%$, III – $1,67 \pm 0,14\%$, I – $1,04 \pm 0,15\%$. При этом разброс индивидуальных частот хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови у детей из III и I зон колебался от 0 до 4–4,5%, в II зоне – от 0 до 3%.

Для большей наглядности здесь и далее порядок зон приведен в соответствии с величиной выявления хромосомных аберраций.

Однако, несмотря на более низкую вариабельность данных во II зоне, обобщенные данные свидетельствуют о более неблагополучной обстановке в этом поселке. Так, если в I и III зонах количество детей, у которых не обнаружено хромосомных аберраций, составило 17 и 14% соответственно, то во II зоне таковых было в 3 раза меньше – примерно 5%. Показатель, ха-

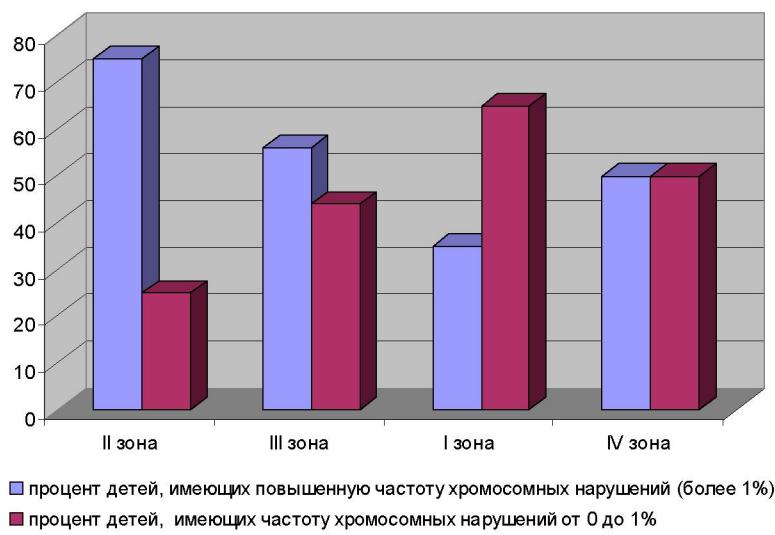


Рис. 1. Распределение детей по частоте хромосомных аберраций

рактеризующий повышенный уровень хромосомных нарушений (более 1%), составил в III и I зонах 56 и 35% соответственно, а в зоне II – 75% (т.е. 3/4 всех обследованных) (см. рис. 1).

Таким образом, дальнейший анализ полученных данных показал, что дети трех зон различаются не только по общей, но и по индивидуальной частоте хромосомных аберраций.

Данные анализа метафазных пластинок лимфоцитов периферической крови детей из пос. Алатау Алматинской области, принимаемых в нашем исследовании за группу сравнения, представлены в табл. 1.

Обнаруженная частота хромосомных нарушений – $0,93 \pm 0,14\%$ у детей группы сравнения соответствует данным ВОЗ ($0,90 \pm 0,09\%$) для контрольных показателей. Представлял определенный интерес анализ спектра обнаруженных хромосомных аберраций (см. табл. 1).

Оказалось, что основным видом нарушений являются аберрации хроматидного типа – сви-

детели действия различных химических генотоксикантов. Они в основном представлены одиночными разрывами или фрагментами, в единичных случаях встречались обмены. Аберрации хромосомного типа, несмотря на их невысокую частоту, представлены более разнообразно – наряду с двойными разрывами и фрагментами отмечались также дицентрики и транслокации.

Анализ спектра хромосомных нарушений по обследованным населенным пунктам еще раз подтверждает, что наиболее неблагополучной в плане загрязненности среды генотоксикантами является II зона. К тому же у 63% из этой зоны выявляются аберрации хромосомного типа, а в III зоне таковых существенно меньше – 39 и 26%.

Наряду с этим среди найденных нарушений была наибольшей – 24,5% – доля аберраций хромосомного типа, при этом почти половину из них составляли аберрации обменного типа (дицентрики, транслокации) – маркеры радиационного воздействия (рис. 2).

Таблица 1. Спектр хромосомных нарушений у детей обследованных групп

Категория аберраций	III зона	II зона	I зона	IV зона	По данным ВОЗ
Количество метаф	8300	3300	4500	4500	-
Общая частота аберраций	$1,67 \pm 0,14$	$1,84 \pm 0,13$	$1,04 \pm 0,15$	$0,93 \pm 0,14$	$0,90 \pm 0,09$
Аберрации хромосомного типа:	$0,27 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,12$	$0,13 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,06$
парные ацентрические фрагменты	$0,18 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,09$	$0,11 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,06$
ацентрические кольца	$0,01 \pm 0,01$	0	0	0	-
дицентрики	$0,08 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,02$	-	-
транслокации		$0,15 \pm 0,07$			-
Аберрации хроматидного типа:	$1,4 \pm 0,13$	$1,39 \pm 0,21$	$0,91 \pm 0,14$	$0,91 \pm 0,14$	$0,57 \pm 0,07$
одиночные фрагменты	$1,38 \pm 0,12$	$1,39 \pm 0,21$	$0,91 \pm 0,14$	$0,87 \pm 0,14$	$0,57 \pm 0,07$
обмены	$0,01 \pm 0,01$	-	-	$0,04 \pm 0,02$	-

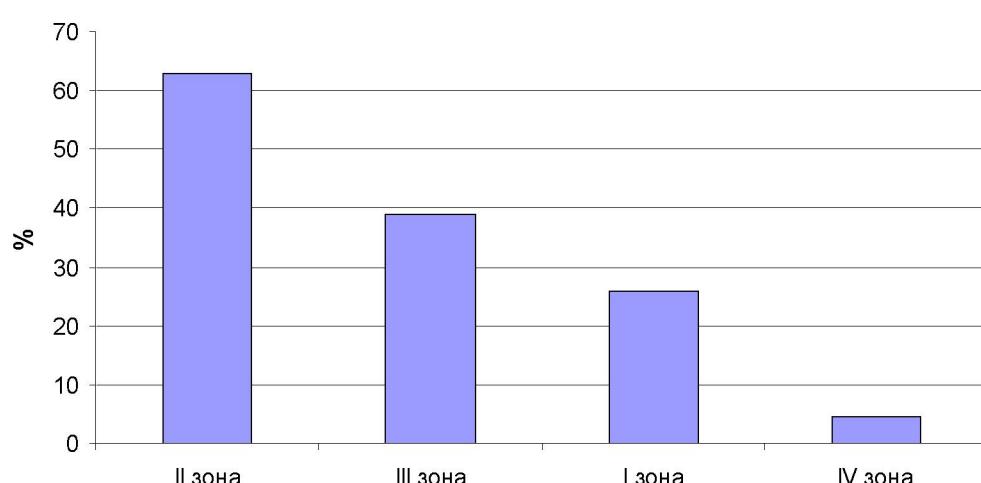


Рис. 2. Процент детей, имеющих аберрации хромосомного типа

Как следует из рис. 2, в III и I зонах величина двухударных повреждений хромосом существенно ниже – 16,2 и 12,5% соответственно. К тому же исходя из общей частоты хромосомных нарушений, во II зоне этот показатель превышает данные из IV зоны максимум в 2 раза, при сравнении же с I зоной вообще отсутствует достоверная разница ($P>0,05$). Если основываться на данных о доле аберраций хромосомного типа, различия становятся более чем очевидными – превышение наблюдается в 6–10 раз.

Сравнительный анализ данных, полученных у детей из I, II, III и IV зон, показал, что в обследованных популяциях детей из II и III зон частота хромосомных аберраций превышает данный показатель IV зоны в 1,9 и 1,7 раза соответственно, у детей из I зоны он повышен всего в 1,04 раза (табл. 2).

Нами также были предприняты попытки распределения обследованных детей по возрастному показателю. Оказалось, что средний возраст детей во II и III зонах составил 13–14 лет, в I и IV зонах – 11–12 лет.

Результаты определения частоты хромосомных аберраций в зависимости от возраста представлены на рис. 3.

Как следует из рис. 3, возрастно-зависимое увеличение частоты хромосомных аберраций наблюдалось лишь в группе детей из III зоны (1,1; 1,4; 2,1%). Среди детей из II зоны наибольший выход аберраций был у 10–15-летних, при этом в младшей и старшей возрастной группах уровень хромосомных нарушений был примерно одинаков (1,5 и 1,6% соответственно). У детей из I и IV зон наблюдается противоположная картина – наибольшие частоты хромосомных нарушений выявлены в младшей группе, т.е. до 10-летнего возраста. Таким образом, эти результаты свидетельствуют об отсутствии зависимости частоты хромосомных аберраций от возраста. Полученные результаты согласуются с данными литературы об отсутствии влияния возраста на цитогенетические показатели. Более того, многолетние исследования, проведенные Н. П. Бочковым (1993), показывают, что частоты хромосом-

Таблица 2. Сравнительная частота хромосомных и хроматидных аберраций у детей, проживающих в 3-х разных населенных пунктах, расположенных в разной удаленности от Аральского моря

Зона	Число обследованных детей	Средний возраст	Изучено метафаз	Частота хромосомных нарушений	Соотношение типов хромосомных аберраций		Общее превышение над контролем (раз)
					Хромосомного типа	Хроматидного типа	
II	19	14	3300	1,84±0,13	24,5	75,5	1,9
III	43	13	8300	1,67±0,14	16,2	83,8	1,7
I	24	11	4500	1,04±0,15	12,5	87,8	1,04
IV	22	12	4500	0,93±0,14	2,2	97,8	-

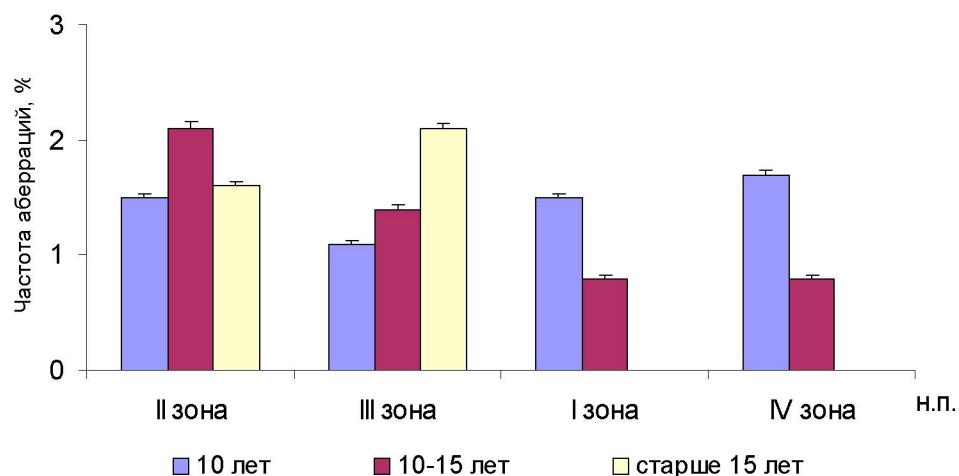


Рис. 3. Частота аберраций хромосом по возрастным группам

ных нарушений у детей сравнимы с аналогичными показателями у взрослого населения как в контрольных популяциях, так и в популяциях из неблагоприятных в экологическом плане регионов.

Таким образом, цитогенетический анализ показал, что из трех обследованных нами поселков Приаральского региона II и III зоны, вероятно, более неблагополучны в экологическом плане, чем I зона. Причину этого обстоятельства объяснить исходя лишь данных по частоте хромосомных нарушений трудно. Требуется сравнительный анализ данных прямого определения качественного и количественного состава загрязнителей среды по отдельным поселкам.

В заключение необходимо отметить, что до настоящего времени в регионе Приаралья не проводилась комплексная оценка здоровья детского населения, включающая изучение состояния хромосомного аппарата клеток при проживании детей в условиях высокого содержания мутагенов в окружающей среде.

Всего обследовано 86 детей из разных населенных пунктов Приаралья, расположенных на разном расстоянии от Аральского моря (I, II и III зоны). Обнаружено статистически достоверное повышение хромосомных аберраций.

Негативное влияние окружающей среды не зависит от близости к Аральскому морю. Напротив, в более отдаленных населенных пунктах, например во II зоне, генотоксические эффекты выявлены больше. Дифференциальный анализ частоты аберраций хромосомного и хроматид-

ного типов по отдельным населенным пунктам показал, что доля аберраций хромосомного типа в 6–10 раз выше по сравнению с IV зоной также в II и III зонах.

В эту ситуацию вносит, по-видимому, вклад дальнейшее распространение загрязнения региона солями высохшего дна Арала, а также отходами урановой промышленности и последствиями деятельности Семипалатинского испытательного полигона.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jensen S., Mazhitova Z., Ritzen M., Zetterstrem R. Environmental pollution and child health in the Aral Sea region in Kazakhstan // The Science of the Total Environment. 1997. N 206. P. 187-193.
2. Постановление Верховного Совета КазССР «О неотложных мерах по решению экологических и социально-экономических проблем в зоне Приаралья» // Каз. правда. 1990. № 123. С.3.
3. Самуратова Р.Б., Мажитова З.Х. Клинико-генетический анализ у детей кризисной зоны Приаралья // Педиатрия и детская хирургия. 1997. №4. С.5-8.
4. Hungerford D.A. Leucocytes cultured from Small Inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL // Stein. Techn. 1965. V.4. P.333-338.

Резюме

Арал маңында тұратын балалардың хромосома санындағы өзгерістерінің жиілігі мен түрі зерттелді.

Экологиялық қаупі жоғары (II аймақ) аймақта тұратын балалардағы хромосомалық аберрациялардың жиілігі тек қана бақылау тобымен ғана емес, сонымен қатар экологиялық қаупі ете жоғары (I аймақ) аймақта тұратын

балалармен салыстырганда жоғары екендігі анықталды.

Summary

We studied the frequency and the spectrum of chromosome aberration from children residing in Priaral region. It is shown, that the children in zone of maximum ecological risk (zone II) have high frequency of chromosome aberration not only in comparison with control group, but the children residing abnormally ecological risk (zone I).

At the same time the spectrum of chromosome aberrations

is shown in the form of chromatide aberrations, which is typical for chemical effect and also in the form of chromosome aberrations. From data of cytogenetic analysis we suppose that except chemical factors other unstated complementary factors effect on organism of children residing in zone III (minimum ecological risk), which evidently determine increasing of the frequency of aberration of chromosome type (dicentrics, pair acentric fragments and circles). Detection of aberrations of chromosome and chromatide types in more distant inhabited locality from Aral Sea can be explained subsequent spreading pollution by salt of Aral and also by wasted of uranium.