

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ В ОЦЕНКЕ ТОКСИКО- ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ МАЛЫХ ДОЗ α -ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2009 А.В. Ларионов¹, А.В. Шапошникова¹, В.Г. Дружинин^{1,2}

¹ Кемеровский государственный университет

² Институт экологии человека СО РАН, г. Кемерово

В работе представлены результаты изучения частоты и спектра хромосомных aberrаций в группе 132 детей-подростков проживающих в южной части Кемеровской области – Горной Шории. Частота aberrантных метафаз в исследуемой группе ($4,74\% \pm 0,21$) выше по сравнению с базисной контрольной группой. Также обнаружено возрастание частот отдельных типов aberrаций: хроматидных ($2,83\% \pm 0,16$) и хромосомных разрывов ($1,89\% \pm 0,14$) и обменов хромосомного типа ($0,32\% \pm 0,05$) у жителей Горной Шории в сравнении с базисной контрольной группой. Стабильно высокие значения фоновых хромосомных aberrаций указывают, что на популяцию человека в Горной Шории постоянно воздействуют генотоксические факторы. В качестве основной причины рассматривается длительное воздействие повышенных концентраций радона. Проводились радиологические исследования в местах проживания и обучения детей. Концентрация радона в воздухе помещений школы-интерната в зимний период превысила допустимый уровень (до 200 Бк/м^3).

Ключевые слова: цитогенетика, α -излучение, хромосомные aberrации, радон

Радон – радиоактивный инертный газ без цвета и запаха, образующийся при распаде ^{238}U . Вклад радона и продуктов его распада в естественный радиационный фон составляет более 60% и более 50% в общую дозу облучения человека [1]. В результате эпидемиологических исследований установлена прямая зависимость риска развития рака легкого от концентрации радона в профессиональных условиях шахт и подземных выработок [2, 3]. В то же время остается спорным вопрос о воздействии радона в воздухе жилых и общественных помещений. Экспозиция радоновым излучением пропорциональна времени проводимому в помещении и максимальна в зимнее время, когда помещения реже проветриваются.

Таким образом, проблему можно сформулировать как возможность переноса

модели риска профессионального облучения радоном и продуктами его распада на воздействие более низких концентраций радона в жилых и общественных помещениях. До недавнего времени не было подтверждений данной гипотезы, поскольку для доказательства карциногенного воздействия радона в непрофессиональных условиях требовалось собрать большой объем эпидемиологических данных. В работе, объединившей результаты 13 исследований в 9 странах Европы, было показано значительное возрастание риска рака легкого при увеличении концентрации радона в жилых помещениях. По оценке исследователей вклад радона в общую смертность от рака легких в Европе составляет около 20000 случаев в год, что соответствует 9% от общей смертности от рака легких и 2% смертности от рака в целом [4].

На фоне этих эпидемиологических данных представляет интерес оценка длительного воздействия малых концентраций радона в жилых помещениях с использованием систем биологической индикации. Очевидные требования к выбору данного метода: 1) чувствительность к радиационному воздействию, особенно α -излучению;

Ларионов Алексей Викторович, аспирант кафедры генетики. E-mail: ravve@mail.ru

Шапошникова Алина Викторовна, аспирант кафедры генетики

Дружинин Владимир Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики

2) возможность интегральной оценки качества окружающей среды; 3) оценка суммарного мутагенного и генотоксического воздействия. Нами выбран цитогенетический метод оценки частоты и спектра структурных aberrаций хромосом в кратковременных культурах лимфоцитов крови, как метод, максимально отвечающий выдвинутым критериям. Этот метод рекомендован ВОЗ для осуществления биологической индикации воздействия радиации на популяции человека [5]. Кроме того установлено, что уровень aberrаций, регистрируемый в соматических клетках, является биомаркером риска развития рака в будущем [6].

Для проведения исследования была выбрана южная часть Кемеровской области – Горная Шория. Выбор сделан на основе использования метода картографирования цитогенетических эффектов у населения крупных промышленных регионов [7]. В ходе работы были локализованы районы, характеризующиеся неблагоприятной эколого-генетической обстановкой, в частности Горная Шория. В этом районе радиационный фон по данным лаборатории радиологической экспертизы центра Госсанэпиднадзора в пределах нормы. Следует учитывать, что эти данные относятся прежде всего к γ -фону и не исключают возможность воздействия радона. Для оценки воздействия радона как возможного экологического фактора индуцирующего генотоксические и канцерогенные эффекты в организме человека, проведено цитогенетическое обследование детей, проживающих и обучающихся в доме-интернате г. Таштагола. Анализ выполнен в сочетании с радиологическими исследованиями концентрации радона в воздухе жилых и учебных помещений. Выбор детей в качестве обследуемой группы представляется оптимальным ввиду минимального воздействия вредных привычек, а также стандартизованных условий проживания в интернате.

Методы исследования. В работе приведены данные о частоте хромосомных aberrаций в 48-часовых культурах лимфоцитов периферической крови у 132 детей – подростков в возрасте 10-19 лет, компактно проживающих в образовательном учреждении интернатного типа, расположенном

на территории Таштагольского района Кемеровской области. Половозрастная структура группы представлена в табл. 1.

Таблица 1. Пол и возраст детей-подростков, включенных в исследуемую группу

Индивиды	Число	Возраст (M±m)	Вариации возраста
всего:	132	14,2±0,18	10-19
мальчики	66	14,2±0,28	10-19
девочки	66	14,2±0,22	11-19

Подготовку препаратов метафазных хромосом осуществляли с использованием стандартного метода, подробно описанного ранее [8]. Длительность культивирования составляла 48-50 ч. За 2 часа до фиксации в культуры добавляли колхицин в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. По окончании культивирования клетки обрабатывали гипотоническим раствором 0,55% KCl в течение 10-15 мин. при 37°C. Фиксацию материала проводили в 3 сменах охлажденного фиксатора Кларка (3:1). Клеточную суспензию раскапывали на чистые охлажденные, смоченные водой предметные стекла. Препараты сушили вблизи пламени спиртовки (не поджигая), шифровали и окрашивали 2% раствором красителя Гимза (Merk). Анализ хромосомных aberrаций проводили без кариотипирования. Отбор метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям [9]. Учитывали четыре основные категории aberrаций: хроматидные и хромосомные разрывы (фрагменты); хроматидные и хромосомные обмены. Ахроматические пробелы в число aberrаций не включали, а регистрировали отдельно.

Проводились радиологические исследования в местах проживания и обучения детей, включая измерения γ -фона, замеры удельной объемной активности радона в воздухе, суммарной объемной активности α - и β -излучающих радионуклидов, объемной активности Rn-222 и Cs-137 в пробах водопроводной и питьевой воды и удельной активности радионуклидов (цезий-40, торий-232, калий-40, радий-226) в образцах почв.

Статистическую обработку осуществляли средствами «STATISTICA for WINDOWS 6.0». Использовали методы непараметрической статистики. Сравнение групп осуществляли с помощью рангового U-теста Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Результаты изучения хромосомных aberrаций в группе детей-подростков из Горной Шории представлены в табл. 2. Для сравнения приведены данные цитогенетического исследования детей-подростков из этого же района, выполненные в 1992 г. [10], а также данные о фоновом уровне хромосомных мутаций в группе жителей

экологически чистых деревень в Кемеровском регионе – базисный контроль [11].

Доля aberrантных метафаз в группах детей-подростков из Горной Шории увеличена по сравнению с базисной контрольной группой ($p < 0,001$). Значения отдельных категорий aberrаций: хроматидных и хромосомных разрывов, а также обменов хромосомного типа были достоверно выше у жителей Горной Шории в сравнении с базисной контрольной группой. Стабильно высокие значения фоновых цитогенетических нарушений в целом указывают, что на популяцию человека в Горной Шории постоянно воздействуют генотоксические факторы.

Таблица 2. Хромосомные aberrации в группах детей-подростков из Горной Шории: в 2005 г. (данное исследование), в 1992 г. [10] и в базисной контрольной группе [11]

Группа / год исследования	Изучено индивидов	Доля aberrантных метафаз, %	Число aberrаций на 100 клеток			
			фрагменты		обмены	
			одиночные	парные	хроматидные	хромосомные
Горная Шория 2005	132	4,74±0,21**	2,83±0,16**	1,89±0,14**	0,05±0,02	0,32±0,05**
Горная Шория 1992	28	5,78±0,63**	3,93±0,49*	1,82±0,36*	0,04±0,04	0,32±0,14
Базисная контрольная группа 1986–2001	110	2,86±0,26	2,08±0,22	0,89±0,14	0,04±0,02	0,08±0,03

Достоверно отличается от значений для базисной контрольной группы: * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$.

Особенно важен тот факт, что обмены хромосомного типа (включающие дицентрические и кольцевые хромосомы) также чаще регистрировались у детей-подростков из Горной Шории как в 1992 г. (0,32±0,14), так и в 2005 г. (0,32±0,05). Известно, что эта категория aberrаций является хорошим маркером воздействия радиации. Поэтому мы полагаем, что результаты цитогенетического исследования выборки из Горной Шории в 2005 г. подтверждают гипотезу о том, что основным кластогенным фактором в этом горном районе является радиация [10].

Наличие выраженных кластогенных эффектов (особенно в части радиационных маркеров), стабильно воспроизводящихся в когортах детей-подростков из Горной Шории в сочетании с нормируемыми

показателями γ -фона, говорит о необходимости изучения содержания радона. Такое исследование было выполнено в местах проживания и обучения обследованных детей в зимне-весенний период 2007-2008 гг. Результаты трехкратных замеров удельной объемной активности радона, осуществленных в воздухе жилых и учебных помещений школы-интерната г. Таштагола, приведены в табл. 3. Для сравнения приведены результаты измерений в двух контрольных сельских населенных пунктах, расположенных в равнинной части Кемеровской области. Концентрация радона в воздухе помещений школы-интерната в зимний период превысила допустимый уровень (до 200 Бк/м³) для эксплуатируемых зданий [12].

Таблица 3. Результаты измерений удельной объемной активности радона, в воздухе жилых и учебных помещений школы-интерната г. Таштагола и в контрольных населенных пунктах

Населенный пункт	Дата измерений	Число точек замеров	Средняя удельная объемная активность радона, Бк/м ³ , $M \pm m$	Пределы вариаций, Бк/м ³ - Бк/м ³
г. Таштагол	20.12.2007	11	235±44*	68 – 583
г. Таштагол	06.02.2008	6	415±53*	232 – 617
г. Таштагол	13.05.2008	5	200±42**	101 – 334
с. Красное	25.01.2008	12	106±18	39 – 203
с. Пача	16.05.2008	6	64±22	20 – 135

* – достоверно различается от значения для с. Красное, $p=0,008$; ** – достоверно различается от значения для с. Пача, $p=0,02$.

Таким образом, можно говорить о том, что условия проживания и обучения детей-подростков в школе-интернате г. Таштагол не соответствуют санитарно-эпидемиологическим нормам по параметрам радиационной безопасности. Вероятно, данная популяция подвержена хроническому воздействию сверхнормативных доз радонового излучения, что в свою очередь может вызывать выраженные генотоксические эффекты, регистрируемые на протяжении долгого времени.

Известно, что у шахтеров урановых или иных шахт, подверженных воздействию высоких доз радонового излучения, уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах крови существенно превышает контрольные значения [13, 14]. Доказано также, что высокие значения показателя доли aberrантных метафаз, а также частоты хроматидных разрывов у шахтеров имеют значимую ассоциацию с увеличением риска развития рака [15].

В отличие от экспозиции радоном в условиях производства, данные об эффектах воздействия этого радиоактивного газа на частоту хромосомных aberrаций у жителей противоречивы. Возможными причинами этому является относительно низкая концентрация радона в жилищах и (или) ограниченное число обследованных индивидов [16]. В работе шведских исследователей было показано, что повышение уровня содержания радона в воздухе (>200 Бк/м³) ассоциировано с увеличением уровня повреждений ДНК в лимфоцитах ($p<0,05$). В то же время никакой корреляции между содержанием радона в питьевой

воде и уровнем генетических повреждений выявлено не было [17].

В ряде работ для оценки возможности индукции стабильных обменов хромосомного типа в выборках жителей домов с разной концентрацией радона была использована технология флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [16, 18, 19]. Практически ни в одной из цитируемых публикаций не приводятся сведения о значимом увеличении частоты транслокаций в выборках лиц проживающих в условиях даже очень высоких концентраций радона в воздухе. Вместе с тем, отмечено, что частота нестабильных хромосомных обменов (дицентрических и кольцевых хромосом) достоверно увеличена в выборке жителей зданий, где концентрация радона была >200 Бк/м³ по сравнению с аналогичным показателем в группе контроля ($2,45 \pm 0,50 \times 10^{-3}$ и $1,03 \pm 0,15 \times 10^{-3}$; $p<0,05$) [16].

Эффективность использования рутинных цитогенетических тестов при оценке кластогенных эффектов воздействия сверхнормативных концентраций радона в воздухе помещений продемонстрирована исследователями из Словении [20]. Цитогенетическое обследование 85 учащихся (37 девочек и 48 мальчиков в возрасте 9-12 лет) методами оценки хромосомных aberrаций и микроядер в культурах лимфоцитов крови показало статистически значимое увеличение клеток с повреждениями в опытной группе по сравнению с контролем. Доля метафаз с aberrациями в выборке детей из Словении, подверженных воздействию высоких радона (2,03%) [20], оказалась более чем в два раза ниже аналогичных показателя для

детей из Горной Шории (4,74% в 2005 г., см. табл. 2). Можно предположить, что для формирования кластогенных эффектов важным является не только повышенное содержание радона в воздухе, но и фактор длительности его воздействия. С этих позиций постоянное проживание и обучение в помещениях интерната, обеспечивает длительный контакт с радоновым излучением.

Выводы:

1. Обследованные дети, подвержены влиянию стабильно действующих факторов токсико-генетического риска.

2. Возрастные, половые особенности обследованных, а также химическое загрязнение почв не вызывают значительной модификации частоты цитогенетических показателей. Кроме того, в исследованные группы не включены лица с хроническими патологиями, также вакцинированные и страдающие вирусными инфекциями люди. Это свидетельствует в пользу предположения о ведущей роли радона в увеличении частоты хромосомных aberrаций у обследованного контингента.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-96031-р_урал_a; государственным контрактом Миннауки № 02.512.11.2233.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- National Council on Radiation Protection and Measurements. Ionizing radiation exposure of the population of the United States. NCRP Report 93. Bethesda, Md: National Council on Radiation Protection and Measurements, 1987.
- Redford, E.P. Lung cancer in Swedish iron miners exposed to low doses of radon daughters / E.P. Redford, K.G. Renard // N. Engl. J. Med. – 1984. – 310. – 1485-1494.
- Lubin, J.H. Radon and Lung Cancer Risk: A Joint Analysis of 11 Underground Miner Studies / J.H. Lubin, Jr.R. Boice, C. Edling et al. / NIH Publication 94-3644 // Washington: National Institutes of Health, National Cancer Institute, 1994.
- Darby, S. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies / S. Darby, D. Hill, A. Auvinen et al. // BMJ. – 2005. 330(7485):223.
- WHO. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. // IPCS Environmental Health Criteria 155. Geneva: World Health Organization. 1993. – 82 p.
- Norppa, H. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk / H. Norppa, S. Bonassi, I.-L. Hansteen et al. // Mutat. Res. – 2006. – V.600. № 1-2. – P. 37-45.
- Дружинин, В.Г. Региональный подход к мониторингу хромосомных aberrаций в популяциях человека с использованием метода картографирования генотоксических эффектов / В.Г. Дружинин, Н.В. Мокрушина, А.Н. Волков и др. // Мед. генетика. – 2004. - №8. – С. 363-369.
- Hungerford, P.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // Stain Techn. 1965. – V.40. – P. 333-338.
- Bucton, K.E. Methods for the analysis of human chromosome aberrations / K.E. Bucton, H.J. Evans // Environment 155, WHO. Geneva. – 1993. – 66 p.
- Дружинин, В.Г. Цитогенетические эффекты у детей-подростков из разных районов Кемеровской области / В.Г. Дружинин, А.Ю. Лифанов, Т.А. Головина / Генетика. – 1995. – Т. 31, №7. – С. 983-987.
- Дружинин, В.Г. Количественные характеристики частоты хромосомных aberrаций в группе жителей крупного промышленного региона Западной Сибири // Генетика. – 2003. – Т.39, №8. – С. 1-8.
- Крисяк, Э.М. Радиационный фон помещений // М.: Энергоатомиздат, 1989. – 257 с.
- Popp, W. Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study/ W. Popp, U. Plappert, W.U. Muller et al. // Radiat. Environ. Biophys. – 2000. – V.39, №4. – P. 275-282.
- Mészáros, G. Long-term persistence of chromosome aberrations in uranium miners / G. Mészáros, G. Bognár, G.J. Köteles // J. Occup. Health. – 2004. – V. 46, №4. – P. 310-315.
- Smerhovsky, Z. Increased risk of cancer in radon-exposed miners with elevated frequency of chromosomal aberrations / Z. Smerhovsky, K. Landa, P. Rössner et al. // Mutat. Res. – 2002. – V.15, №514. – P. 165-176.
- Oestreicher, U. Cytogenetic analysis in peripheral lymphocytes of persons living in houses with increased levels of indoor radon concentrations / U. Oestreicher, H. Braselmann, G. Stephan // Cytogenet. Genome Res. – 2004. – V. 104, № 1-4. – P. 232-236.
- Hellman, B. Alkaline single cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a study on subjects with residential exposure to radon / B. Hellman, L. Friis, H. Vaghef, C. Edling // Mutat. Res. – 1999. – V.25, №442. – P. 121-132.

18. *Bauchinger, M.* Quantification of FISH-painted chromosome aberrations after domestic radon exposure / *M. Bauchinger, H. Braselmann, U. Kulka et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1996. – V. 70, №6. – P. 657-663.
19. *Lindholm, C.* Domestic radon exposure and the frequency of stable or unstable chromosomal aberrations in lymphocytes / *C. Lindholm, I. Mäkeläinen, W. Paile et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* – 1999. – V. 75, №8. – P. 921-928.
20. *Bilban, M.* Chromosome aberrations study of pupils in high radon level elementary school / *M. Bilban, J. Vaupoti* // *Health Phys.* – 2001. – V. 80, №2. – P. 157-163.

CYTOGENETIC BREAKINGS IN ESTIMATION OF GENOTOXIC RISK OF α -RADIATION SMALL DOSES LONG INFLUENCE

© 2009 A.V. Larionov¹, A.V. Shaposhnikova¹, V.G. Druzhinin^{1,2}

¹ Kemerovo State University

² Institute of Human Ecology of SB of RAS, Kemerovo

In work results of studying the frequency and spectrum of chromosomal aberrations in group of 132 children-teenagers living in a southern part of the Kemerovo area - Mountain Shoria are presented. Frequency of aberrant metaphases in investigated group ($4,74\% \pm 0,21$) is above in comparison with basic control group. Also increase of frequencies of separate types of aberrations is revealed: chromatid ($2,83\% \pm 0,16$), both chromosomal breaks ($1,89\% \pm 0,14$) and exchanges of chromosomal type ($0,32\% \pm 0,05$) at inhabitants of Mountain Shoria in comparison with basic control group. Stably high values of background chromosomal aberrations specify that a human population in Mountain Shoria constantly influenced by genotoxic factors. As a principal cause it is considered the long influence of the raised concentration of radon. Radiological researches were carried out in places of residing and training of children. Concentration of radon in air of boarding school premises during the winter period has exceeded an admissible level (up to 200 Bq/m^3).

Key words: cytogenetics, α -radiation, chromosomal aberrations, radon

Alexey Larionov, Graduate Student, Genetics

Department. E-mail: pavve@mail.ru

Alina Shaposhnikova, Graduate Student, Genetics

Department

Vladimir Druzhinin, Doctor of Biology, Professor,

Head of the Genetics Department