

УДК 574.2:504.75.05+577.346: 576.08

## ГЕНОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В БУККАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ ГОРНЯКОВ, РАБОТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ОБЛУЧЕНИЯ ПРИРОДНЫМИ ИСТОЧНИКАМИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2011 Д.А. Петрашова<sup>1</sup>, Н.К. Белишева<sup>1</sup>, И.И. Пелевина<sup>2</sup>, Н.А. Мельник<sup>3</sup>, Ф. Зользер<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Кольский научный центр РАН, г. Апатиты

<sup>2</sup> Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, г. Москва

<sup>3</sup> Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья  
им. И.В. Тананаева Кольского научного центра РАН, г. Апатиты

<sup>4</sup> Университет Южной Богемии, Чешская Республика

Поступила в редакцию 12.10.2011

Представлены результаты исследования цитогенетических нарушений в клетках буккального эпителия горняков, подвергающихся хроническому облучению природными источниками ионизирующего излучения. Установлено, что генотоксичные эффекты в буккальном эпителии горняков проявляются в существенном снижении частоты встречаемости клеток без видимых нарушений, возрастании числа клеток с некротическими изменениями и в возрастании в 26 раз числа двуядерных клеток по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: *горняки, ионизирующая радиация, буккальный эпителий, цитогенетические нарушения*

Подземная разработка руды, содержащей такие природные радионуклиды, как уран, торий, радий, представляет определенную опасность для здоровья горных рабочих вследствие смешанного облучения различными видами ионизирующего излучения: вдыхание/глотание пылевых частиц, содержащих радий (альфа-испускающий элемент, продукт распада урана), вдыхание радона и продуктов его распада (источник альфа-, бета-, гамма- и нейтронного излучения), внешнее облучение тела (гамма-радиация от руды, альфа-радиация от радона и т.д.); вдыхание пыли смешанных частиц радиоизотопов. Но наиболее опасным фактором

для человека является радон [12], который может распространяться на значительные расстояния и создавать в рудничной атмосфере высокие концентрации. По данным Научного комитета ООН от 5 до 20% всех онкологических заболеваний связано с воздействием на организм радона. Международное агентство по изучению раковых заболеваний отнесло радон к числу канцерогенов первой группы, поэтому генотоксичность радона широко изучается в разных странах мира [1, 6, 10, 13, 16]. В целом, радон обладает кластогенным, генотоксическим эффектом, индуцирует хромосомные aberrации широкого класса и влияет на полиморфизм генов.

Для выявления генотоксических эффектов ионизирующих источников излучения наиболее широкое распространение получил микроядерный тест, используемый при культивировании клеток периферической крови в условиях цитокинетического блока, что создает уникальную возможность проанализировать весь спектр изменений, характеризующих нестабильность генома [2, 4, 5]. Однако в определенных случаях генотоксические эффекты предпочтительнее изучать на буккальном эпителии, который позволяет при минимальном инвазивном вмешательстве получать информацию о генетических изменениях в клетках человека [9]. Этот метод впервые был предложен в 1983 г. [14] и в настоящее время получил

*Петрашова Дина Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела медико-биологических проблем адаптации человека в Арктике. E-mail: petrashova@admksk.apatity.ru*

*Белишева Наталья Константиновна, доктор биологических наук, руководитель отдела медико-биологических проблем адаптации человека в Арктике. E-mail: natalybelisheva@mail.ru*

*Пелевина Ирина Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник. E-mail: pele@chph.ras.ru*

*Мельник Наталья Александровна, кандидат технических наук, доцент, заведующая аккредитованной региональной лабораторией радиационного контроля. E-mail: melnik@chemy.kolasc.net.ru*

*Зользер Фридо, доктор биологических наук, руководитель отделения радиобиологии и токсикологии факультета здоровья и социальных исследований. E-mail: zoelzer@zsf.jcu.cz*

широкое распространение при массовом мониторинге генотоксических эффектов факторов окружающей среды [3, 9], в том числе, при оценке степени генотоксичности производственных токсикантов [8].

**Цель исследования:** оценка генотоксических и цитотоксических эффектов природных источников ионизирующего излучения, включающих радон и дочерние продукты его распада, на буккальном эпителии горняков, пребывающих под землей в условиях смешанного ионизирующего излучения.

**Материал и методы.** Материалом исследования служили образцы буккального эпителия горняков, работающих под землей на производстве, связанном с добычей и обогащением лопаритовых руд (Ловозерский р-н, Мурманская обл.) и контрольной группы здоровых испытуемых, проживающих в г. Апатиты Мурманской обл. Группы испытуемых состояли из 10 и 8 курящих мужчин, соответственно, в возрасте от 25 до 40 лет. Лопаритовая руда, наряду с ценными металлами (Ti, Ta, Nb и др.) содержит примеси природных радионуклидов ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ), являющихся источником смешанных видов ионизирующего излучения, заряженные частицы которого оседают на пыли и взвешках, содержащихся в шахтном пространстве, поэтому клетки буккального эпителия являются первым барьером [9], возникающим на пути у канцерогенов, поступающих в организм при дыхании, с водой и с пищей.

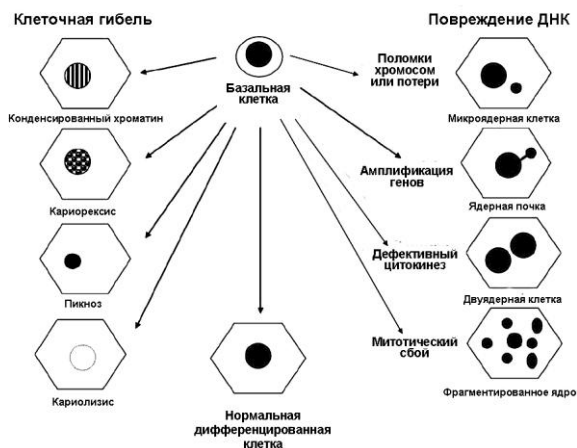
Взятие образцов буккального эпителия и процедуры приготовления препаратов проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [3]. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа AXIOSTAR PLUS (Karl Zeiss, Германия) (об.15 x ок.40), оснащенного камерой CoolSNAPes (Photometrics) с цифровой системой регистрации и обработки изображения на базе ПЗС камеры с программным обеспечением (Media Cybernetics, Inc.). Анализ частоты встречаемости клеток с генетическими нарушениями и цитотоксическими эффектами проводили на отдельно лежащих и распластанных клетках с подсчетом не менее 1000 клеток на каждом препарате. Микроядра идентифицировали как хроматиновые округлые тела с гладким непрерывным краем, размером не более 1/3 ядра, лежащих отдельно от основного ядра, не преломляющих свет, с интенсивностью окрашивания и рисунком хроматина, как у основного ядра, и находящихся в одной плоскости с ядром [15]. Кроме того, учитывали двуядерные клетки, ядра с насечкой, кариопикноз, кариорексис, кариолизис, фрагментацию и

вакуолизацию ядра, нарушения типа ядерных почек и апоптозные тельца. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA 6.

Регистрация смешанных видов ионизирующего излучения (альфа-, бета-, гамма- и нейтронное излучение) проводилась в шахте сотрудниками аккредитованной региональной лаборатории радиационного контроля ИХ-ТРЭМС КНЦ РАН по аттестованным методикам на сертифицированном оборудовании: радиометр-спектрометр МКС-А-03-1Н; радиометр гамма-излучения ДКГ-07Д «Дрозд» ФВКМ.412113.026; аэрозольный альфа-радиометр РАА-20П2 «Поиск»; альфа-радиометр РАА-3-01 «Альфа-АЭРО».

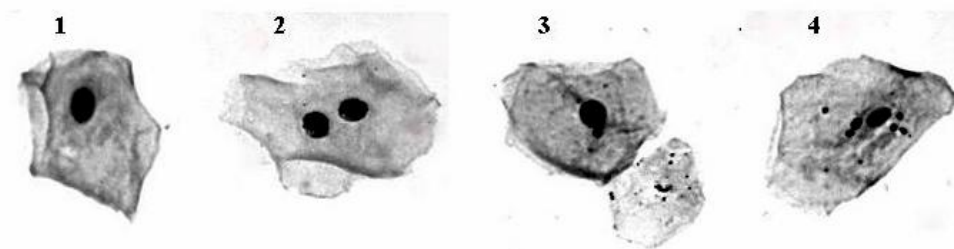
**Результаты и обсуждения.** Исследования, проведенные в шахте Ловозерского района (п. Ревда) по измерению содержания природных радионуклидов, входящих в ряды  $^{232}\text{Th}$  и  $^{238}\text{U}$ ,  $^{40}\text{K}$ , на поверхности рудного тела и в различных шахтных отсеках показали, что, при отсутствии техногенных радионуклидов ( $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  и др.), мощность экспозиционной дозы (МЭД) на поверхности выхода рудного тела достигала 1,9 мкЗв/ч, в то время как гамма-фон и МЭД, измеренные на всем протяжении шахты, находились в пределах 0,5-1,5 мкЗв/ч. Гамма-фон за пределами шахты на производственной площади рудника и в здании управления не превышал 0,2 мкЗв/ч. В воздушном пространстве всех шахтных отсеков было выявлено наличие дочерних продуктов распада  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{228}\text{Ra}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ : радиоактивные газы радон и торон, а также RaA, RaB и RaC. Кроме того, была обнаружена значительная эманация радиоактивных газов на поверхности рудного тела на основе оценки коэффициента равновесия природных радионуклидов, который находился в диапазоне 0,20-0,75. Для средних концентраций радона значения основных продуктов его распада (RaA и RaC) были равны 2720 Бк/м<sup>3</sup> и 3760 Бк/м<sup>3</sup>, соответственно. Объемная радиоактивность радона ( $^{222}\text{Ra}$ ) и торона ( $^{220}\text{Ra}$ ) в различных местах шахты изменялась в 10-36 раз. Максимальные концентрации радона (до 20000 Бк/м<sup>3</sup>) были выявлены непосредственно в забое и в плохо вентилируемых местах. Превышение нормативного суммарного значения эквивалентной равновесной объемной активности (ЭРОА) Rn и Tn в 2-14 раз (НРБ-99/2009, п.5.3.3.) было зарегистрировано во многих участках шахты, величины которых варьировали в зависимости от места отбора проб. Таким образом, можно видеть, что горняки подвергаются хроническому облучению смешанными источниками ионизирующего

излучения природного происхождения, генотоксические эффекты которого были изучены на клетках буккального эпителия. При оценке цитогенетических изменений клеток буккального эпителия использовали маркеры, приведенные на рисунке 1.



**Рис. 1.** Схематическая диаграмма различных типов буккальных клеток и возможные механизмы их возникновения (По N. Holland et. al [9])

Большинство клеток буккального эпителия имеют большую площадь цитоплазмы относительно ядра и клетки имеют скорее полигональную форму, чем сферическую, за исключением базальных клеток. Геномная нестабильность или токсическое воздействие на базальные клетки ведет к хромосомным нарушениям или потери хромосом и формированию микроядер (МЯ). Некоторые клетки с геномными нарушениями могут быть элиминированы посредством апоптоза. Дочерные клетки из базального слоя могут дифференцироваться в «шиповатые клетки», которые, в конечном итоге, дифференцируются в плоские и ороговевшие клетки слизистой поверхности, отслаивающиеся с поверхности ротовой полости. Каждая из этих типов клеток может содержать МЯ, частота встречаемости которых варьирует в широких пределах. Молекулярные механизмы, приводящие к различным событиям клеточной гибели и их взаимоотношения пока не выяснены [9]. На рис. 2 представлены клетки буккального эпителия без видимых нарушений (1), двуядерные клетки (2), клетки с МЯ (3) и с апоптозными телами (4).



**Рис. 2.** Различные типы клеток буккального эпителия: 1 – без видимых нарушений, 2 – двуядерные; 3 – с МЯ; 4 – с апоптозными телами

**Таблица.** Частоты встречаемости клеток с гено- и цито-токсическими эффектами в контрольной группе и у горняков (%)

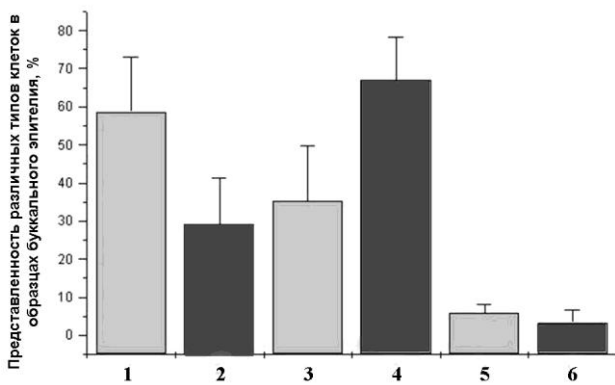
Показатели	M±m		Уровень значимости
	контроль	горняки	
клетки с нормальным ядром	<b>58,70±5,09</b>	<b>29,23±3,86</b>	<b>p=0,0002</b>
клетки с микроядрами	0,16±0,04	0,11±0,038	p=0,3675
клетки с кариолизисом	<b>27,02±3,84</b>	<b>49,25±5,53</b>	<b>p=0,0064</b>
клетки с кариопикнозом	4,26±1,08	6,81±1,09	p=0,1202
клетки с кариорексисом	<b>0,38±0,18</b>	<b>4,72±1,44</b>	<b>p=0,0107</b>
клетки с вакуолизацией ядра	3,54±0,67	6,14±1,68	p=0,2076
клетки с фрагментацией ядра	4,03±0,55	2,13±0,87	p=0,1025
клетки с апоптозными тельцами	1,88±0,37	0,93±0,29	p=0,0561
клетки с двумя ядрами	<b>0,016±0,016</b>	<b>0,42±0,09</b>	<b>p=0,0015</b>
клетки с ядерными «почками»	-	0,09±0,04	
клетки с насечкой ядра	-	0,17±0,07	

Результаты анализа частоты встречаемости клеток с генетическими и цитотоксическими эффектами у горняков и в контрольной

группе приведены в таблице. Можно видеть, что число клеток с нормальным ядром в контрольной группе в 2 раза больше, чем в группе

горняков ( $p=0,0002$ ). У горняков в 1,8 раз больше клеток с кариолизисом ( $p=0,0064$ ), в 12,4 раза больше клеток с кариорексисом ( $p=0,0107$ ) и в 26,2 раз больше двуядерных клеток.

Оказалось, что встречаемость клеток с микроядрами в контрольной группе и у горняков достоверно не различаются ( $p=0,3675$ ), а число клеток с апоптозными тельцами в 2 раза выше в контрольной группе, чем у горняков ( $p=0,0561$ ). При объединении всех типов цитологических и ядерных нарушений, характеризующих гибель клеток по типу некроза или апоптоза, оказалось, что в группе горняков преобладает гибель клеток буккального эпителия по типу некроза (66,9% клеток) по сравнению с контролем, где некротическим изменениям подвергается 35,2% клеток при значимости различий  $p=0,0001$ . То есть у горняков в 1,9 раз чаще встречается гибель клеток буккального эпителия по типу некроза. В то же время в контроле гибель клеток по типу апоптоза встречается в 1,8 раз чаще, чем в группе горняков. Частота встречаемости клеток с признаками апоптоза в контрольной группе составляет 5,9% против 3,3% в группе горняков ( $p=0,0771$ ) (рис. 2).



**Рис. 2.** Сравнительное распределение клеток буккального эпителия без видимых нарушений (1, 2), лизированных (3, 4) и с признаками апоптоза (5, 6) в контрольной группе (светлые столбцы) и у горняков (темные столбцы)

**Выводы:** мы показали, что в буккальном эпителии горняков генотоксические эффекты, вызванные облучением смешанных источников ионизирующего излучения природного происхождения проявляются в существенном снижении частоты встречаемости клеток без видимых нарушений, возрастании числа клеток с некротическими изменениями и в возрастании более, чем на порядок двуядерных клеток по сравнению с контрольной группой. Резкое возрастание двуядерных клеток в группе

горняков по сравнению с контрольной группой может свидетельствовать о воздействии ионизирующей радиации на процесс цитокinesis, нарушение которого может приводить к появлению многоядерных клеток. В исследованиях на клеточных культурах было показано, что при возрастании интенсивности нейтронной компоненты у поверхности Земли в результате солнечных протонных событий, число многоядерных клеток в клеточных культурах различного онтогенетического и филогенетического происхождения, возрастало синхронно с возрастанием интенсивности нейтронной компоненты у поверхности Земли [7]. Не исключено, что при облучении горняков смешанными источниками ионизирующего излучения, вклад нейтронной компоненты, образующийся при взаимодействии альфа частиц с молекулами атмосферы, может проявляться в возрастании числа многоядерных клеток в буккальном эпителии горняков. Возрастание частоты встречаемости двуядерных клеток в 26,2 раза в буккальном эпителии горняков и снижение частоты апоптоза в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой свидетельствует о низкой эффективности работы механизма программируемой гибели клеток (апоптоза) у горняков, призванного элиминировать дефектный генетический материал, что служит неблагоприятным прогностическим признаком и свидетельствует о высокой степени генотоксичности смешанных типов ионизирующего излучения в условиях горно-рудного производства.

*Работа поддержана грантом РФФИ и Администрацией Мурманской области, проект № 10-04-98809-п\_север\_а.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Васильева, З.Ж. Связь полиморфизма генов GSTM1 и GSTT1 с количественным уровнем цитогенетических нарушений у рабочих уранового производства / З.Ж. Васильева, Р.И. Берсимбаев, Б.О. Бекманов, И.Е. Воробцова // Радиационная биология. Радиоэкология. 2010. Т. 50, № 2. С. 148-152.
2. Ингель, Ф.И., Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока // Экологическая генетика. 2006, Т.IV, №3. С. 7-19.
3. Мейер А.В., Дружинин В.Г., Ларионов А.В., Толочко В.А. Генотоксические и цитотоксические эффекты в буккальных эпителиоцитах детей, проживающих в экологических различающихся районах Кузбасса // Цитология. – 2010. – Т.52, №4. – С.305-310.
4. Пелевина, И.И. Молекулярно-клеточные последствия аварии на ЧАЭС / И.И. Пелевина, Г.Г. Афанасьев, А.В. Алещенко и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51, № 1. С. 154-161.

5. Пелевина, И.И. Связь молекулярно-клеточных параметров и иммунного статуса лимфоцитов крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС / И.И. Пелевина, И.В. Орадовская, Ю.Г. Мансурова и др. // Рад. биология. Радиозэкология. 2010. Т. 50, № 5. С. 501-507.
6. Abo-Elmagd, M. Cytogenetic effects of radon inhalation / M. Abo-Elmagd, Manal M. Daif, H.M. Eissa // Radiation Measurements. 2008. Vol. 43. P. 1265-1269.
7. Belisheva, N.K. The effect of cosmic rays on biological systems – an investigation during GLE events / N.K. Belisheva, H. Lammer, H.K. Biernat, E.V. Vashenuyk // Astrophysics and Space Sciences Transactions. (в печати).
8. Diler, S.B. Cytogenetic Biomonitoring of Carpet Fabric Workers Using Micronucleus Frequency, Nuclear Changes, and the Calculation of Risk Assessment by Repair Index in Exfoliated Mucosa Cells / S.B. Diler, A. Celik // DNA AND CELL BIOLOGY. 2011. Vol. XX, № XX. P. 1-7.
9. Holland, N. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage. The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps / N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders et al. // Mutat Res. 2008. Vol. 659(1-2). P. 93-108.
10. Khan, M.A. Inhaled radon-induced genotoxicity in Wistar rat, Syrian hamster, and Chinese hamster deep-lung fibroblasts in vivo / M.A. Khan, F.T. Cross, R.L. Buschbom, A.L. Brooks // Mutation Res. 1995. V. 334, issue 2. C. 131-137.
11. Mihalache, D. Incidence of radiation-induced micronuclei in occupationally exposed subjects / D. Mihalache, V. Preoteasa, A. Petrescu // Romanian J. Biophys., Bucharest. 2007. Vol. 17, No. 2. P. 119-128.
12. Miller, C. The Biological Effectiveness of Radon-Progeny Alpha Particles. III. Quality Factors / C. Miller, Y. Huang, E.J. Hall // Radiat. Res. 1995. V.142. C. 61-69.
13. Rămboiu, S. Effect of Radon-222 and its daughter inhalation on reproduction in rats exposed under natural conditions / S. Rămboiu, E. Bordás, A. Olinic // Radon in the Living Environment. 19-23 April 1999. – Athens, Greece. P. 869-877.
14. Stich, H.F. Adaptation of the DNA-repair and micronucleus tests to human cell suspensions and exfoliated cells / H.F. Stich, R.H. San, M.P. Rosin // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1983. Vol. 407. P. 93-105.
15. Tolbert, P.E. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development / P.E. Tolbert, C.M. Shy, J.W. Allen // Mut. Res. 1992. 271. P. 69-77.
16. Zolzer, F. Enhanced frequency of micronuclei in lymphocytes from current as opposed to former uranium miners / F. Zolzer, Z. Freitinger Skalicka, R. Havrankova et al. // J. Appl. Biomed. 2011. Vol. 9. P. 151-156.

## GENOTOXICAL EFFECTS IN BUCCAL EPITHELIA AT MINERS, WORKING IN THE CONDITIONS OF IRRADIATION BY NATURAL SOURCES OF IONIZING RADIATION

© 2011 D.A. Petrashova<sup>1</sup>, N.K. Belisheva<sup>1</sup>, I.I. Pelevina<sup>2</sup>, N.A. Melnik<sup>3</sup>, F.Zolzer<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Kola Scientific Center RAS, Apatity

<sup>2</sup> Institute of Chemical Physics named after N.N. Semyonov RAS, Moscow

<sup>3</sup> Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Mineral Raw Materials  
named after I.V. Tananaev of Kola Scientific Center RAS, Apatity

<sup>4</sup> University of Southern Bohemia, Czech Republic

Results of research the cytogenetic infringements in cells of buccal epithelium at miners who are exposed to chronic exposure by natural ionizing radiation sources are presented. It is established that genotoxic effects in buccal epithelia at miners in essential decrease in frequency of occurrence the cells without visible infringements, increase of number of cells with necrotic changes and in increase in 26 times the number of two-nuclear cells in comparison with control group are shown.

Key words: *miners, ionizing radiation, buccal epithelium, cytogenetic infringements*

---

Dina Petrashova, Candidate of Biology, Research Fellow at the Department of Medical-biological Problems of Human Adaptation in Arctic. E-mail: petrashova@admksk.apatity.ru  
Nataliya Belisheva, Doctor of Biology, Chief of the Department of Medical-biological Problems Of Human Adaptation in Arctic. E-mail: natalybelisheva@mail.ru  
Irina Pelevina, Doctor of Biology, Professor, Main Research Fellow. E-mail: pele@chph.ras.ru  
Nataliya Melnik, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor, Chief of the Accredited Regional Laboratory of Radiating Control. E-mail: melnik@chemy.kolasc.net.ru  
Zolder Frido, Doctor of Biology, Chief of the Radiobiology and Toxicology Department at the Faculty of Health and Social Researches. E-mail: zolzer@zsf.jcu.cz