

Ткаченко М.М.,
Любарець Т.Ф.

ІНДЕТЕРМІНІСТИЧНІ ЕФЕКТИ ОПРОМІНЕННЯ: ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ПРОБЛЕМИ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ
ДУ "Науковий центр радіаційної медицини НАМН України", м. Київ

Резюме: в огляді представлені теоретичні і практичні дані щодо виявлення ушкоджень генетичного матеріалу в осіб, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання, з використанням сучасних методів обстеження. Аналізуються механізми розвитку генетичних ушкоджень як підгрунтя канцерогенезу в опромінених в різних дозах осіб.

Ключові слова: гени, індетерміністичні ефекти, іонізуюче випромінювання, мутації, хромосоми.

Починаючи з середини 20-х рр. минулого сторіччя побічні наслідки впливу іонізуючого випромінювання (ІВ), включаючи і його канцерогенні ефекти, знаходяться в центрі уваги науковців. Накопичений більш ніж сторічний досвід спостереження за особами, які зазнали впливу ІВ у зв'язку з професійним та/або аварійним "переопроміненням", дозволив в подальшому систематизувати виявлені наслідки і розподілити їх на індетерміністичні (стохастичні) та детерміністичні (нестохастичні).

Індетерміністичні (лат. *determinare* - визначати, обумовлювати) або стохастичні (гр. *stochos* - мішень), вірогідні, випадкові ефекти за визначенням Міжнародного комітету з радіаційного захисту (МКРЗ) – "це ті ефекти, для яких вірогідність виникнення, а не його тяжкість, розглядається як функція дози без порогу" (публікація МКРЗ № 26). Іноді індетерміністичні ефекти називають віддаленими наслідками опромінення. Для стохастичних наслідків дозовий поріг відсутній і ймовірність їх виникнення існує при опроміненні в будь-якій дозі, відмінній від нуля. Дозозалежною є лише імовірність виникнення наслідків, а не

ступінь їхньої тяжкості. Науковий комітет по дії атомної радіації (НКДАР) і МКРЗ дійшли висновку, що доведено існування лише двох основних видів стохастичних ефектів опромінення: виникнення злоякісних пухлин і ушкоджень генетичного матеріалу, що спричиняють захворювання у наступних, народжених від опромінених осіб, поколінь.

На даний час накопичений значний досвід щодо виявлення радіаційно індукованих ушкоджень генетичного матеріалу в соматичних клітинах людини. Для біоіндикації радіаційного впливу широко застосовуються цитогенетичні методи дослідження, оскільки культура лімфоцитів людини дозволяє достатньо точно визначити саме ІВ як мутагенний чинник. Матеріали численних вітчизняних і зарубіжних цитогенетичних досліджень стали основою для розробки рекомендацій Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), Міжнародної агенції по дії атомної енергії (МАГАТЕ), НКДАР ООН щодо практичного використання даного методу як методу біологічної дозиметрії (ICRP, 1974; UNSCEAR, 1982) [10, 23, 22, 37, 30]. Подальшими дослідженнями було показано, що вміст хромосомних аберацій нес-

стабільного типу в лімфоцитах надає можливість визначати дозу ІВ в найближчі терміни після опромінення. Але у віддаленому періоді після впливу радіаційного чинника кількість традиційних маркерів (дицентричних, поліцентричних хромосом, центричних кілець, фрагментів) поступово знижується внаслідок оновлення лімфоцитарної популяції, що ускладнює оцінку величини отриманої дози. У зв'язку з цим, на теперішній час окрім стандартного забарвлення хромосом застосовуються такі специфічні забарвлення хромосом як G-диференційоване і флуоресцентне з використанням *in situ* гібридизації клітин (FISH-метод). Ці методи надають можливість виявляти не лише нестабільні (дицентрики, центричні кільця), але й стабільні аберації хромосом (транслокації, інсерції, інверсії), які можуть бути потенційним джерелом малігнізованих клітин [20, 21, 25].

Цитогенетичне обстеження працівників ядерно-хімічних підприємств у віддаленому періоді після припинення професійного контакту з ІВ свідчить про підвищення у них частоти нестабільних хромосомних аберацій [25]. У осіб, які зазнали гострого аварійного опромінення з наступним розвитком у них гострої променевої хвороби (ГПХ), у віддаленому (10 і більше років) пострадіаційному періоді середня частота як нестабільних, так і стабільних хромосомних аберацій суттєво зростала. Частота стабільних (транслокації) аберацій значно перевищувала частоту нестабільних (дицентрики) хромосомних аберацій. Середня частота стабільних аберацій (повні та неповні транслокації), виявлених методом FISH, співпадала з частотою обмінних стабільних аберацій, які визначалися з використанням методу повного каріотипування G-диференційованого забарвлених хромосом.

Обстеження учасників ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на Чорнобильській АЕС (ЧАЕС) у 1986 р. через 5–20 років після опромінення дозволило визначити терміни, протягом яких частота аберацій хромосом зменшується в 2 рази: для частоти дицентриків цей термін складає 3 роки, для відсотка клітин з дицентриками – 3,7 року, для частот всіх нестабільних аберацій – 3,6 року, для клітин з нестабільними абераціями хромосом – 4,4 року [8]. Через 20 років у осіб даної групи сумарна кількість цитогенетичних маркерів радіаційного впливу залежала від отриманих доз ІВ і ста-

новила для обстежених з дозовими навантаженнями 0,7–2,3 Гр – 30 %, за умов дії доз 2,8–4,3 Гр – 50 %, при інкорпорованих дозах 4,7–9,8 Гр – 90 %.

Особливістю цитогенетичних змін в УЛНА на ЧАЕС було виявлення в 10 % випадків мультіаберантних (МАБ) клітин в популяції лімфоцитів периферичної крові (ПК), в індукції яких певну роль відіграють α -випромінюючі радіонукліди [18]. Частота появи МАБ клітин (на 1000 клітин) становила 0,82–24,9 при їх відсутності у осіб контрольної групи. Частота появи дицентриків і центричних кілець у немультіаберантних клітинах в цій же групі УЛНА більш, ніж у 2 рази перевищувала їх кількість порівняно з іншими опроміненими клітинами. Кореляційної залежності між дозою опромінення, кількістю інкорпорованого ^{137}Cs та частотою появи МАБ клітин не виявлено. Цей феномен в УЛНА узгоджується з даними літератури: подібні зміни мали місце у жителів Хіросіми і Нагасакі, які зазнали атомного бомбардування [46], та осіб, які народились від опромінених; у дитячого та дорослого населення, яке проживає на територіях, забруднених радіонуклідами внаслідок Чорнобильської катастрофи.

Цитогенетичне обстеження дітей в Україні, опромінених внутрішньоутробно внаслідок аварії на ЧАЕС, у віддаленому післяаварійному періоді свідчить про підвищення частоти структурних аномалій хромосом з переважанням стабільних ушкоджень і переважною локалізацією розривів в хромосомах 1, 2, 3, 5, 7, 11, 13, 17 [15]. У дітей, які зазнали тривалої дії радіаційного чинника в період внутрішньоутробного розвитку і на наступних етапах онтогенезу, спостерігається збільшення частоти як стабільних, так і нестабільних індукованих ІВ хромосомних аберацій і підвищена пошкоджуваність хромосом 1, 4, 5, 9, 17, 22. У обох категорій постраждалих дітей виявлена кореляція між еквівалентною дозою опромінення червоного кісткового мозку і кількістю аберантних клітин та типом хромосомних аберацій.

Селективний цитогенетичний моніторинг критичних груп постраждалого населення України свідчить, що у різні терміни після опромінення частота аберацій хромосом в лімфоцитах ПК (як інтегральних, так і специфічних для дії ІВ *in vivo*) вірогідно перевищує доаварійні показники, характерні для спонтанного хромосомного мутагенезу [17]. Підвищена

частота хромосомних аберацій виявлена у дітей, які зазнали комбінованого опромінення ^{131}I і ^{137}Cs , особливо на ендемічних по йоду територіях. Встановлено взаємозв'язок тиреоїдної патології і хромосомної нестабільності соматичних клітин людини [47]. Виявлено віддалений цитогенетичний ефект в послідовних генераціях клітин у нащадків опромінених батьків, що свідчить про існування трансмісії хромосомної нестабільності [4].

Результати цитогенетичного обстеження дітей, які проживають на контамінованих радіонуклідами територіях Росії і Білорусі протягом 17 років після аварії на ЧАЕС і зазнають впливу малих доз опромінення, показали, що у даного контингенту має місце суттєве (в 2–5 разів порівняно з контролем) підвищення стабільних і нестабільних хромосомних аберацій, у тому числі дицентричних хромосом та центричних кілець [14, 24]. В той же час, у дітей даної категорії не виявлено достовірного зв'язку між частотою виявлення хромосомних аберацій і захворюваністю.

У внутрішньоутробно опромінених дітей цих же регіонів частота нестабільних і стабільних хромосомних аберацій була ще вищою і перевищувала контрольні значення у 3–6 разів [14, 24]. Рівень цитогенетичних порушень залежав від стадії ембріонального розвитку – найвища частота аберацій хромосомного типу, а також сумарна частота дицентриків і центричних кілець спостерігалась в першому гестаційному періоді (0–8 тижнів) і мала місце у всіх 100 % опромінених дітей. Для дітей даної групи встановлена кореляція між підвищеним рівнем цитогенетичних порушень і наявністю патології щитоподібної залози, органів травного тракту та дихальної системи.

Методи визначення визначення соматичних мутацій генів в стовбурових клітинах, які зберігають життєздатність протягом тривалого проміжку часу, дозволяють більш коректно оцінити ступінь впливу ІВ на організм порівняно з цитогенетичним обстеженням. Виявлення мутацій генів також дозволяє прогнозувати ризик канцерогенезу у опромінених осіб на більш ранніх етапах обстеження порівняно з структурними мутаціями. Наявність мутацій такого типу можливо оцінити шляхом виявлення або відсутності білкових продуктів синтезу відповідних генів. Дослідження мутацій генів, які зумовлені впливом радіаційного чинника, надає мож-

ливість виявляти невеликі за розміром ушкодження ДНК, які призводять до нестабільності геному у нащадків опромінених клітин.

Відомі на теперішній час генетичні наслідки дії ІВ дозволяють поділити їх на ранні і віддалені. До ранніх належать ефекти, які проявляються загибеллю нащадків опромінених батьків на різних етапах онтогенезу, появою вроджених дефектів і аномалій розвитку. До віддалених генетичних ефектів опромінення відносять підвищений ризик канцерогенезу і фізіологічна неповноцінність нащадків опромінених батьків.

Аналіз генетичних наслідків опромінення є досить складним, оскільки ті або інші генетичні дефекти мають приблизно 10 % новонароджених і важко відокремити випадки, обумовлені впливом саме радіаційного чинника. Експертні оцінки показують, що хронічне опромінення протягом 30-ти років з сумарним дозовим навантаженням 1 Зв призводить до появи приблизно 2000 випадків генетичних захворювань на кожний мільйон новонароджених від опромінених батьків.

У віддалені терміни після опромінення на стан геному соматичних клітин можуть впливати різноманітні фактори, які можуть як збільшувати, так і зменшувати ступінь ушкодження генетичного матеріалу [11]. З часом, у пострадіаційному періоді відбувається елімінація частини соматичних клітин з мутаціями [43, 48]. В першу чергу гинуть клітини з грубими порушеннями, які впливають на життєздатність. Потім, внаслідок природного оновлення популяції клітин, які диференціюються, починається елімінація мутантних клітин з обмеженим терміном життя. Елімінація клітин з ушкодженим генетичним матеріалом може проходити різними шляхами, у тому числі – шляхом апоптозу [10]. В ряді робіт показана наявність взаємозв'язку між ступенем ушкодження ДНК, що має місце в мутантних клітинах, та інтенсивністю процесів апоптозу.

Найбільш тривало зберігаються хромосомні і генні мутації, які не впливають на життєздатність, поділ клітини і які виникли в клітинах з тривалим терміном життя, наприклад у стовбурових гемопоетичних елементах. З іншого боку встановлено, що вплив радіаційного чинника не обмежується тимчасовими змінами, які можуть бути виявлені безпосередньо після опромінення [2, 13, 42]. Експер-

ментальними дослідженнями показано, що у віддалені терміни після дії ІВ у частини нащадків опромінених клітин може виникати нестабільність геному. Застосування методу оцінки мутацій генів, який базується на визначенні частоти мутантних по генам Т-клітинного рецептора (TCR) лімфоцитів ПК [40], дозволяє дослідити віддалені мутагенні ефекти опромінення соматичних клітин, у тому числі – мутації, які виникають *de novo* внаслідок зростаючої нестабільності геному. Мутації генів в клітинах ПК також можливо оцінити з використанням глікофоринового тесту.

За даними обстеження осіб у віддалені (30–40 рр.) терміни після гострого опромінення в дозах 0,5–6,0 Гр у третини осіб встановлено підвищення частоти TCR-мутантних лімфоцитів [11]. Через 10 років після пролонгованого опромінення в дозах до 0,25 Гр 15 % обстежених мають підвищену частоту TCR-мутантних лімфоцитів, частка цих осіб залежить від віку на момент опромінення. За умов інкорпорації радіоактивного плутонію у 74 % обстежених виявлено зростання кількості TCR-мутантних лімфоцитів. У частини УЛНА на ЧАЕС з дозами опромінення до 0,25 Гр через 9–13 років також виявлено підвищення частоти TCR-мутантних клітин, що свідчить про нестабільність геному соматичних клітин і потребує виділення груп ризику щодо онкологічної патології.

Дослідження свідчать, що частота TCR-мутантних клітин корелює з величиною дозового навантаження протягом 4 років після опромінення [10]. Вплив ІВ в діапазоні малих доз зумовлює підвищення частоти виявлення мутантних TCR-лімфоцитів і підтверджує наявність радіаційно-індукованої генетичної нестабільності даних клітин, яка у частини опромінених зберігається протягом тривалого (9–17 рр.) проміжку часу і залежить від віку осіб на момент контакту з радіаційним чинником.

В найближчі терміни після впливу ІВ кількість еритроцитів з мутаціями локусу глікофору А на одиницю дози залежить від потужності дози: при пролонгованій дії радіаційного чинника їх відсоток в три рази нижчий, ніж при гострому опроміненні [10]. При пролонгованому опроміненні частота виявлення таких клітин на одиницю дози корелює з тривалістю контакту з радіаційним чинником і збільшується при скороченні цього

періоду. В осіб, які зазнали дії ІВ в діапазоні малих доз (до 0,25 Гр), не відмічено підвищення кількості глікофору А-мутантних клітин.

Радіаційно обумовлені генетичні ефекти залежать від стадії онтогенезу на момент дії радіаційного чинника [19]. Генетичні зміни в соматичних клітинах, які оцінюються за частотою TCR-мутантних лімфоцитів, найбільш виражені в опромінених в пренатальному періоді розвитку. Встановлені якісні відмінності щодо частоти виявлення мутантних клітин у опромінених в пренатальному (мають місце у всіх осіб) і постнатальному періодах (визначаються у 12–18 % осіб). Ця закономірність спостерігається у різних контингентів опромінених (жители забруднених радіонуклідами територій, УЛНА, працівники атомної промисловості). Кількість TCR-мутантних лімфоцитів в УЛНА і професійних працівників обернено пропорційна віку на момент контакту з ІВ.

Дані щодо нестабільності геному виявлені у дітей, які народились у батьків, опромінених з приводу пухлинних захворювань, а також у дітей учасників ЛНА на ЧАЕС [1, 6, 27]. Цей факт є свідченням того, що опромінення батьків дестабілізує спадковий апарат нащадків, збільшує ймовірність мутації в будь-яких генах і, зокрема, в тих, які відповідальні за процеси злоякісної трансформації. Отримані результати узгоджуються з даними експерименту щодо передачі мутацій, які виникли в статевих клітинах, наступним поколінням [3, 12, 26].

Для оцінки впливу малих доз ІВ на організм людини перевагу надають методам виявлення мутацій в мікро- і мінісателітних локусах ДНК. Дані методи потребують обстеження значно менших за об'ємом вибірок, ніж при використанні традиційних методів оцінки частоти мутацій, що має значення для біоіндикації і біодозиметрії [12, 28, 31, 32, 33, 35]. Обстеження населення чоловічої статі, яке зазнало тривалого радіаційного впливу внаслідок проживання поблизу р. Теча (дози опромінення 0,03–62,4 сГр), свідчить про суттєве збільшення у них частоти мінісателітних мутацій. У жінок цього ж регіону проживання з дозами опромінення 0,02–49,3 сГр не виявлено збільшення мутацій такого типу.

У дітей з феноменом геномної нестабільності, народжених від опромінених батьків, частіше рееструються зовнішні стигми ди-

зембріогенезу, малі аномалії розвитку внутрішніх органів і вроджені вади. У віддалені терміни після аварії на ЧАЕС виявлено неадекватну реакцію хромосомного апарату на тестуючи мутагенне навантаження *in vitro* – адаптивну відповідь у дитячого населення забруднених територій та нестабільність геному в УЛ-НА із значними індивідуальними коливаннями [4]. Діагностовано вірогідне зростання (до 1,6 разів) частоти мутацій у мінісателітних локусах ДНК дітей, народжених від опромінених батьків, в той час як опромінення матерів не супроводжувалося підвищенням таких мутацій [34].

Підсумовуючи все вищенаведене, очевидно, що ушкодження генетичного матеріалу зумовлює підвищення ризику канцерогенезу в опромінених контингентів. Останніми двома десятиліттями дослідження в області радіаційного канцерогенезу зосередились на клітинних та молекулярних механізмах, які зумовлюють появу радіаційних ефектів і включають: мутації в полігенах життєздатності [44]; наявність різноманітних та/або епігеномних порушень ДНК статевих клітин батьків, що призводить до нестабільності і функціональної неповноцінності геному [5, 78, 49]; мутації в генах, які контролюють основні процеси в ДНК (реплікацію, репарацію, транскрипцію) [36]; мутації в гіперваріабельних локусах [1, 27]. Останніми роками з'явилися дані щодо так званих гіперваріабельних локусах міні- та мікросателітних послідовностей ДНК, високої частоти мутації в них та передачі нащадкам нестабільності геному. Загальною ознакою всіх вищевказаних механізмів є їх полімішенна природа.

Значних успіхів досягнуто в розумінні механізмів репарації ДНК, вивченні генів, залучених до різноманітних сигнальних шляхів апоптозу. Відомо, що ІВ викликає широкий спектр уражень ДНК, включаючи пошкодження нуклеотидних основ, одностраті і двонитчаті розриви (*double-strand breaks* – DSBs). На теперішній час вважається, що аномально відновлені DSBs мають принципове значення для індукції хромосомних аномалій і мутацій генів [29, 42].

Саме здатність до відновлення генетичного апарату, тобто репарація ДНК є важливим аспектом радіочувливості клітин організму. Показана залежність між зниженням ефективності репарації ДНК і підвищеною частотою

спонтанних хромосомних аберацій в клітинах людини при дії ІВ [9]. Дослідженнями встановлено зниження величини індексу репарації ДНК у професійних працівників підприємств атомної промисловості, які зазнають хронічного фракціонованого гама-випромінювання, у віддалені терміни після контакту з ІВ; зниження ефективності репаративного синтезу ДНК у віддалені терміни після гострого аварійного опромінення порівняно з хронічним фракціонованим опроміненням [16]. Цитогенетичне дослідження даної групи осіб, які зазнали хронічного радіаційного впливу, обстежених через 40 і більше років, показало, що частота всіх типів нестабільних хромосомних аберацій у них достовірно перевищувала спонтанний рівень. Частота виявлення дицентриків і центричних кілець в три рази перевищували показники контролю і залежала від сумарної дози опромінення. У обстежених осіб виявлено зворотній кореляційний зв'язок між частотою виявлення маркерів радіаційного впливу і величиною індексу репарації ДНК.

Пошуки генетичних змін, специфічно пов'язаних з радіаційним чинником не увінчались успіхом. Генетичні наслідки дії ІВ можуть проявлятися в клітинах, які не контактували безпосередньо з радіаційним чинником, тобто в клітинах "оточення". Опромінені клітини можуть передавати радіаційно-опосередкованих змін, які виникли в них, невеликій частині (10–6) своїх нащадків першого чи наступного покоління [38]. Припускається, що у меншій мірою, 12-ти, а, можливо, навіть 25-ти поколінь опромінених клітин, виникає мінуча нестабільність геному [45, 50]. Цей, так званий "bystander" ефект (ефект "свідка"), є наслідком порушень міжклітинної взаємодії і активує p53-опосередкований сигнальний шлях апоптозу. Показано, що p53-опосередковане ураження ДНК відповідальне за активацію сигнальних шляхів апоптозу як у опромінених, так і в "bystander" клітинах, що в кінцевому результаті приводить до генетичних змін останніх [38]. Встановлено, що ІВ зумовлює активацію численних шляхів апоптозу, частина з яких пов'язана з неідентифікованими на теперішній час онкогенами і генами-супресорами пухлин [39], що може бути однією з причин виникнення індетерміністичних гемопоетичних наслідків.

Таким чином, основу радіаційного канцерогенезу складають відкриті в культурі клітин

in vitro три феномени: ушкодження ДНК; порушення функціонування онкогенів та генів-супресорів пухлин; наявність "bystander" ефекту. В подальшому ці положення були підтверджені в експерименті на тваринах [45, 50] і дозволили поглибити знання щодо індукції радіаційно-обумовлених захворювань людини, у тому числі – злоякісних пухлин. Наведені дані підтверджують необхідність генетичного моніторингу опромінених контингентів, що

надасть можливість раннього виявлення та профілактики у них соматичної патології. Особливої актуальності ця проблема набуває у рік 25-ліття Чорнобильської катастрофи, що обумовлено як значною кількістю постраждалих в Україні (понад 3,5 млн. осіб зазнали впливу комплексу негативних поставарійних факторів), так і зростанням серед них захворюваності на злоякісні новоутворення.

ИНДЕТЕРМИНИРОВАННЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗЛУЧЕНИЯ: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОБЛЕМЫ

Ткаченко М.Н., Любарец Т.Ф.

Резюме. В обзоре представлены теоретические и практические данные о выявлении поврежденных генетического материала у лиц, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения, с использованием современных методов обследования. Анализируются механизмы развития генетических повреждений как основы канцерогенеза у облученных в разных дозах лиц.

Ключевые слова: гены, индетерминистические эффекты, ионизирующее излучение, мутации, хромосомы.

INDETERMINISTIC EFFECTS OF IONIZING RADIATION: GENETIC ASPECTS OF THE PROBLEM

Tkachenko M.N., Liubarets T.F.

Abstract. The theoretical and practical data on damage of cell genome using modern investigating methods in persons exposed to ionizing radiation are revealed. The mechanisms of cell genome damage as a basis of cancerogenesis in exposed to different doses of ionizing radiation persons are analysed.

Key words: genes, indeterministic effects, ionizing radiation, mutations, chromosomes.

Список літератури у редакції: visnyk_nmu@mail.ru