

РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПОТОМКОВ, ОТЦЫ КОТОРЫХ ПОДВЕРГЛИСЬ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

Ахмадуллина Ю.Р.^{1,2}, Аклеев А.В.^{2,1}

¹ Россия, г. Челябинск, ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный университет»

² Россия, г. Челябинск, ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства»

В данной работе представлены результаты исследования влияния хронического облучения гонад отцов (диапазон индивидуальных доз в год зачатия ребенка составил 0,003 – 0,5 Гр) на радиочувствительность лимфоцитов периферической крови в группе потомков первого поколения (возраст в год обследования в среднем составил 40 лет). Результаты показали, что спонтанная частота лимфоцитов с микроядрами в группе потомков не отличается от значений в группе их отцов и в группе потомков необлучённых лиц аналогичного возраста. Статистически значимое понижение уровня лимфоцитов с микроядрами после *in vitro* облучения суспензии клеток в дозе 1 Гр наблюдалось в группе потомков относительно контроля ($p=0,002$). Однако ни спонтанная частота лимфоцитов с микроядрами, ни индицируемая *in vitro* 1 Гр частота лимфоцитов с микроядрами не зависела от дозы на гонады отца в год зачатия ребёнка.

Ключевые слова: лимфоциты периферической крови, микроядра, потомки облучённого населения, гонадная доза.

RADIOSENSITIVITY OF T-LYMPHOCYTES IN OFFSPRING OF FATHERS CHRONICALLY EXPOSED TO IONIZING RADIATION

Ahmadullina Y.R.^{1,2}, Akleev A.V.^{2,1}

¹ Russia, Chelyabinsk, Chelyabinsk State University

² Russia, Chelyabinsk, Urals Research Center for Radiation Medicine

Presented in this paper are the results of a research into the effects of chronic radiation exposure of the fathers' gonads (the individual doses in the year of the conception of the children ranged from 0.003 to 0.5 Gy) on the radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes in a group of first-generation offspring (the mean age as of the year of the study was 40 years). The results indicated that the spontaneous frequency of lymphocytes with micronuclei in the group of offspring did not differ from that estimated for the group of their fathers, and for the group of unexposed age-matched offspring. A statistically significant decrease in the frequency of lymphocytes with micronuclei following *in-vitro* irradiation of a cell suspension at a dose of 1 Gy was observed in the group of offspring as compared with the controls ($p=0.002$). However, neither the spontaneous frequency of lymphocytes with micronuclei, nor the frequency of lymphocytes with micronuclei displayed after *in-vitro* exposures at doses of 1Gy manifested any dependence on the fathers' gonadal doses in the year of conception.

Keywords: peripheral blood lymphocytes, micronuclei, offspring of exposed population, gonadal dose.

Введение

Эксперименты на животных показывают, что хроническое облучение гонад самцов может приводить к нестабильности генома в клетках их потомков [5; 7]. Исследования генетических эффектов, проведенные в популяциях облучённых людей, не позволяют сделать однозначных выводов о радиационно-индуцированной нестабильности генома в соматических клетках их потомства. Исследования частоты мутаций в мини-сателлитных последовательностях и аберрантных клеток крови потомков, отцы которых выжили после атомной бомбардировки Хиросимы и Нагасаки, не показали различий по сравнению с группой контроля [6]. Однако повышенная частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови отмечена у потомков ликвидаторов ЧАЭС [3]. При изучении хронического

радиационного облучения мужчин, проживавших на территориях р. Теча, была выявлена повышенная частота мутаций в мини-сателлитных локусах ДНК их половых клеток в диапазоне индивидуальных прекоцептивных гонадных доз от 0,3 до 624 мГр, однако четкой зависимости от дозы не наблюдалось [1].

Цель исследования: изучить спонтанную частоту и радиочувствительность лимфоцитов у потомков первого поколения, отцы которых подверглись хроническому радиационному воздействию.

Материалы и методы

Схема исследования

В данной работе проводилось сравнение исходной поврежденности и радиочувствительности Т-лимфоцитов периферической крови у облучённых мужчин (далее отцы) с указанными показателями у их необлучённых потомков первого поколения (далее потомки). Методом оценки поврежденности и радиочувствительности Т-лимфоцитов стал микроядерный анализ.

Отцы подверглись хроническому внешнему и внутреннему облучению вследствие проживания в период 1950–1959 гг. на загрязненных радионуклидами территориях р. Теча. Доза внешнего облучения сформировалась за счет γ -излучающих радионуклидов (главным образом, ^{137}Cs , ^{85}Zr , ^{85}Nb , ^{103}Ru), находившихся в донных отложениях и пойменных почвах. Основными источниками внутреннего облучения в первые сроки после загрязнения реки стали ^{90}Sr , ^{89}Sr , ^{137}Cs и другие изотопы, поступавшие в организм с речной водой и продуктами местного производства [2].

Для оценки повреждающего влияния ионизирующего излучения на лимфоциты периферической крови отцов использовалась доза облучения красного костного мозга (ККМ), которая в значительной степени сформировалась за счет инкорпорированного в костной ткани ^{90}Sr . Изучение изменения частоты клеток с микроядрами в зависимости от дозы облучения ККМ является важным показателем, который может отражать степень радиационного повреждения стволовых кроветворных клеток. Для оценки вклада радиационного фактора в формирование лимфоцитов с микроядрами в группе потомков использовалась доза на гонады отца в год зачатия ребенка. Дозы были рассчитаны в биофизической лаборатории ФГБУН УНПЦ РМ на основе дозиметрической системы TRDS 2009 [8].

Группу потомков составили биологические дети облучённых на реке Теча отцов. Основными критериями включения потомков в исследуемую группу были следующие.

1. Отец потомка проживал в одном из населённых пунктов, расположенных на побережье реки Теча, в период с 1950 по 1959 г.

2. Биологические матери потомков облучённых отцов не проживали на загрязнённых радионуклидами территориях и не подвергались воздействию ионизирующего излучения на территориях р. Теча и Восточно-Уральского радиоактивного следа.

3. Обследуемый потомок облученного отца родился и проживал на незагрязнённых радионуклидами территориях, а, следовательно, не подвергался хроническому радиационному воздействию.

Отсутствие аварийного облучения матерей исключает участие облучённой ядерной и цитоплазматической ДНК в формировании нестабильности генома потомков. Также этот критерий исключает возможность опосредованного влияния облучённого материнского организма на развитие зародыша и плода, а также внутриутробное и постнатальное облучение потомка за счет поступления ^{90}Sr через плаценту и с молоком матери. Таким образом, в исследования были включены потомки облучённых отцов, не подвергавшиеся ни внутриутробному, ни постнатальному облучению, а, следовательно, это позволило изучить роль облучения гонад отцов в развитии радиационно-индуцированной нестабильности генома клеток крови их потомков.

В группу сравнения (контроль-отцы и контроль-потомки) вошли лица, проживавшие на незагрязнённых радионуклидами территориях Челябинской области в близких социально-экономических условиях и имеющие одинаковый характер медицинского обслуживания.

Возрастно-половая и дозиметрические характеристики исследуемых групп приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика обследуемых групп

Группа	Пол, женщины/мужчины	Возраст, лет, $M \pm \delta$ (min-max)	Доза на ККМ, Гр, $M \pm \delta$ (min-max)	Максимальная мощность дозы на ККМ, Гр/год, $M \pm \delta$ (min-max)	Доза на гонады отца в год зачатия, Гр, $M \pm \delta$ (min-max)
Отцы	0/33	69,1 \pm 4,2 (63-76)	1,23 \pm 0,65 (0,08- 2,6)	0,32 \pm 0,20 (0,02- 0,6)	0,11 \pm 0,11 (0,003- 0,5)
Потомки	28/24	40,4 \pm 5,0 (27-52)	0	0	0
Контроль-отцы	0/28	69,8 \pm 6,1 (61-80)	0	0	0
Контроль-потомки	39/11	38,1 \pm 7,2 (24-55)	0	0	0

Микроядерный анализ

Образцы крови были взяты после получения информированного согласия доноров. Подготовительные работы и постановка культуры клеток выполнялась в стерильных условиях. Забор крови производился утром, натощак из локтевой вены в шприц с гепарином.

В культуральные флаконы добавляли 0,7 мл крови, 3,3 мл RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), 20%-ную сыворотку крупного рогатого скота (PAA Laboratories, Австрия), 7 мкг/мл ФГА (ПанЭко). Флаконы с кровью инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37,5 °С 72 часа. Через 29 часов от начала инкубации часть проб подвергали острому γ -облучению в дозе 1 Гр (⁶⁰Co, мощность дозы 0,0017 Гр/с). Через 48 часов от начала инкубации во все пробы добавляли 70 мкл рабочего раствора цитохлазина Б в DMSO (США). Цитохлазин Б блокирует цитокинез клеток, что позволило накопить более 1000 двухъядерных лимфоцитов в препаратах. Фиксация препаратов проводилась в смеси этанол : ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1. На следующем этапе готовили препараты и окрашивали их по Романовскому-Гимза (ПанЭко) в течение 2 часов [4].

Анализ частоты лимфоцитов с микроядрами проводился в двух образцах от каждого пациента: без облучения - спонтанный уровень и с облучением в дозе 1 Гр. Оценивалось количество двухъядерных лимфоцитов с микроядрами на 1000 двухъядерных лимфоцитов. Итого в пробах от каждого пациента анализировалось 2000 клеток.

Методы статистической обработки

Для описания частоты лимфоцитов с микроядрами использовались среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для сравнения частоты лимфоцитов с микроядрами между исследуемыми группами использовался t-критерий Стьюдента.

Связь между дозовыми показателями и частотой лимфоцитов с микроядрами определяли с помощью ранговой корреляции по Пирсону. Статистический анализ проводили в программных пакетах SPSS Statistic 17.0, Excel 2010.

Результаты и обсуждение

В таблице 2 показано, что в группе облучённых отцов средний спонтанный уровень частоты лимфоцитов с микроядрами составил 14,2‰ и в группе потомков – 12,1‰. Сопоставимый уровень клеток с микроядрами был установлен и в контрольных группах: в группе отцов - 13,6‰ и в группе потомков - 12,0‰. Статистически значимых различий в спонтанной частоте лимфоцитов с микроядрами между исследуемыми группами отцов и их потомков, а также между исследуемыми группами и соответствующим контролем не отмечено ($p \geq 0,05$).

После дополнительного облучения *in vitro* в дозе 1 Гр произошло 9–13-кратное увеличение частоты клеток с микроядрами во всех четырёх изучаемых группах по сравнению со спонтанным уровнем. При этом наиболее выраженное увеличение отмечено в контрольных группах отцов и потомков. При сравнении показателей, полученных для родительского поколения, было установлено, что частота лимфоцитов с микроядрами после облучения *in vitro* в дозе 1 Гр составила 122,1‰ в группе отцов и 138,7‰ – в группе

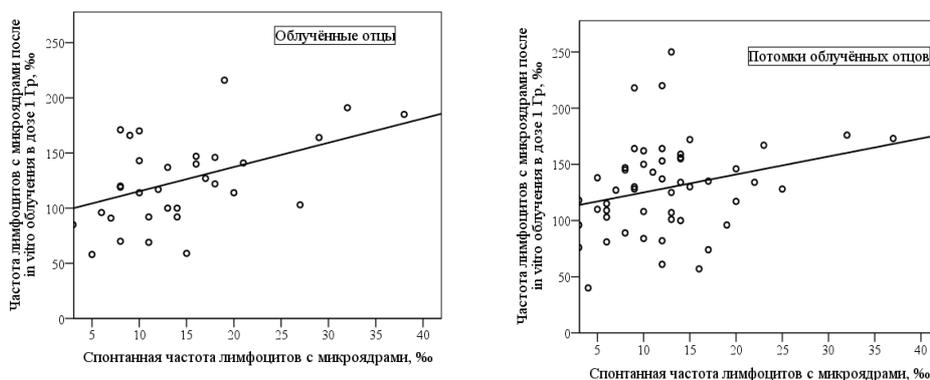
необлучённых отцов ($p=0,1$). Между группами потомков отмечены более выраженные различия: 130,0‰ – в группе потомков облучённых отцов и в контрольной группе - 158,5‰ ($p=0,002$).

Таблица 2 – Частота лимфоцитов с микроядрами в группах обследуемых лиц

Группа	Частота лимфоцитов с микроядрами, ‰	
	M±δ (min-max)	
	спонтанная	после in vitro облучения в дозе 1 Гр
Отцы	14,2±8,2 (2-38)	122,1±39,4 (58-216)
Контроль-отцы	13,6±5,7 (3-23)	138,7±39,0 (49-214)
Потомки	12,1±7,0 (2-37)	130,0 ±41,1 (40-250), p=0,002
Контроль-потомки	12,0±6,0 (2-28)	158,5±34,5 (72-254)

Примечание: p – статистически значимые различия по сравнению с группой контроль-потомки, t-критерий Стьюдента.

Корреляционный анализ зависимости спонтанной частоты клеток с микроядрами и частоты клеток с микроядрами после дополнительного облучения in vitro в дозе 1 Гр (рис. 1) показал наличие достоверной корреляционной связи для групп облучённых отцов ($k=0,5$;



$p=0,01$) и потомков облучённых отцов ($k=0,3$, $p=0,047$). В группе контрольных отцов ($k=0,3$; $p=0,08$) и контрольных потомков ($k=0,3$; $p=0,06$) корреляционная связь была на уровне тенденции.

Рисунок 1. Корреляционная связь частоты лимфоцитов с микроядрами после in vitro облучения в дозе 1 Гр и спонтанной частоты лимфоцитов с микроядрами (группа облучённых отцов и их потомков)

В таблице 3 показано, что не отмечено зависимости спонтанной и индуцированной частоты лимфоцитов с микроядрами от дозы и мощности дозы на ККМ облучённых отцов.

Таблица 3 – Корреляционная связь частоты лимфоцитов с микроядрами от дозы и мощности дозы на ККМ в группе отцов

Частота микроядер, ‰	Доза на ККМ,	Мощность дозы на ККМ,
----------------------	--------------	-----------------------

	Гр	Гр/год
Спонтанная	k=0,08 p=0,7	k=0,2 p=0,3
После in vitro облучения в дозе 1 Гр	k= -0,01 p=0,9	k= -0,01 p=0,9

Из рисунка 2 можно видеть, что частота лимфоцитов с микроядрами (спонтанная и после in vitro облучения в дозе 1 Гр) в группе потомков не зависела от дозы облучения гонад отцов в год зачатия ребёнка.

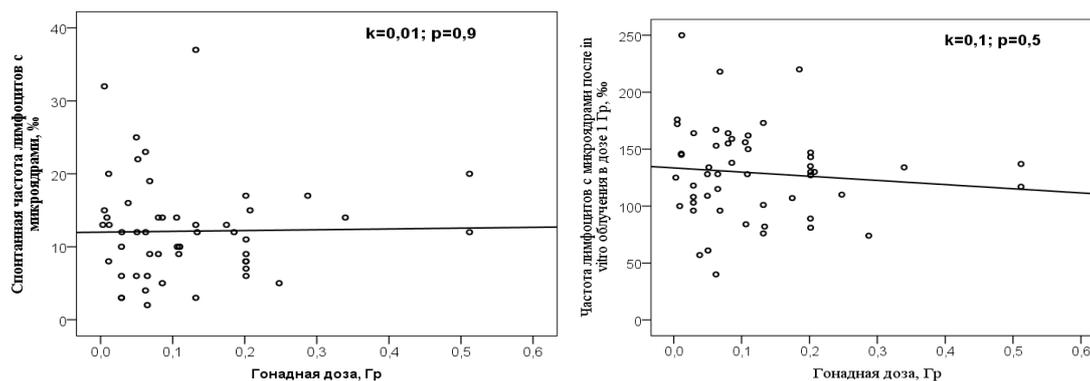


Рисунок 2 – Зависимость частоты лимфоцитов с микроядрами у потомков от прекоцептивной гонадной дозы отца

Заключение

Спонтанная частота лимфоцитов периферической крови с микроядрами в группе потомков первого поколения облучённых отцов не отличается от данного показателя в группе их облучённых отцов и в группе потомков необлучённых отцов аналогичного возраста. Было обнаружено статистически значимое снижение уровня лимфоцитов с микроядрами после in vitro облучения в дозе 1 Гр в группе потомков относительно контрольной группы потомков ($p=0,002$), но при этом частота лимфоцитов с микроядрами не зависела от гонадной дозы отцов в год зачатия потомков. Частота клеток с микроядрами в группе облучённых отцов не зависела от дозы и мощности дозы облучения красного костного мозга.

Список литературы

1. Аклев А.В., Площанская О.Г., Козионова О.С., Дуброва Ю.Е. Анализ мутаций в минисателлитных локусах ДНК лиц из когорты реки Теча // Труды и материалы Третьего международного симпозиума, 20-22 октября 2005 г., г. Челябинск.
2. Медико-биологические и экологические последствия радиоактивного загрязнения реки Теча / под ред. А.В. Аклева, М.Ф. Киселева. – М. : Медбиоэкстрем, 2001. – 532 с.

3. Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Сускова В.С. с соавт. Индивидуальные особенности трансгенерационной геномной нестабильности у детей ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиэкология. - 2008. - Т. 48. - № 2. - С. 278-286.
4. Fenech M., Morley A.A. Measurement of micronuclei in human lymphocytes // Mutation Response. – 1985. - V. 148. – P. 29-36.
5. Hoyes K.P., Lord B.I., McCann C., Hendry J.H., Morris I.D. Transgenerational effects of preconception paternal contamination with (55)Fe // Radiation research. - 2001. – V. 156. – P. 488-494.
6. Kodaira M., Izumi S., Takahashi N., Nakamura N. No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors // Radiation research. - 2004. – V. 162. - № 4. – P. 350-356.
7. Plakhuta-Plakutina G.I. Spermatogenesis in dogs during chronic gamma irradiation over years and in the aftereffect period // Kosmicheskaja biologija i aviakosmicheskaja meditsina. - 1978. - V. 12. - № 6. - P. 50-55.
8. Tolstykh E.I., Degteva M.O., Peremyslova L.M., et al. Reconstruction of long-lived radionuclide intakes for Techa riverside residents: 137Cs // Health Phys. – 2013. – V. 104. - № 5. - P. 481-98.

Рецензенты:

Левина С.Г., д.б.н., профессор, декан естественно-технологического факультета ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный педагогический университет», г. Челябинск.

Тахауов Р.М., д.м.н., профессор, директор Северского биофизического научного центра ФМБА России, профессор кафедры общественного здоровья и организации здравоохранения Сибирского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Северск.