

ИЗУЧЕНИЕ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В СВЯЗИ С ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ДОЗОЙ АКТИВНЫХ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ

Тимофеева А. А.^{1,2}, Минина В. И.^{1,2}, Соболева О. А.¹, Рыжкова А. В.¹, Баканова М. Л.¹, Савченко Я. А.¹, Кулёмин Ю. Е.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии человека Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, annateam86@gmail.com;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кемеровский государственный университет», Кемерово

Исследованы цитогенетические характеристики лимфоцитов крови детей – воспитанников школы-интерната г. Таштагол, подвергающихся воздействию сверхнормативных доз радона. Выявлено увеличение уровня хромосомных aberrаций, что свидетельствует о существовании выраженного генотоксического воздействия факторов окружающей среды. Проанализированы индивидуальные дозы активных рибосомных генов у обследованных детей. Изучена взаимосвязь между уровнем хромосомных aberrаций и дозой активных рибосомных генов. Установлено, что уровень хромосомных aberrаций был статистически значимо выше у носителей средней дозы активных рибосомных генов по сравнению с носителями низкой и высокой дозы. Логистический регрессионный анализ подтвердил наличие положительной ассоциации средней дозы АкРГ (с поправкой на пол и возраст) с увеличением частоты встречаемости высокого уровня хромосомных нарушений (OR= 2,14;0,52 – 8,77). Сделано заключение о важной роли дозы активных рибосомных генов в формировании индивидуальной чувствительности к воздействию радона.

Ключевые слова: хромосомные aberrации, рибосомные гены, радон.

CHROMOSOME ABERRATIONS IN BLOOD LYMPHOCYTES IN CONNECTION WITH INDIVIDUAL DOSE OF ACTIVE RIBOSOME GENES

Timopheeva A. A.^{1,2}, Minina V. I.^{1,2}, Soboleva O. A.¹, Ryzhkova A. V.¹, Bakanova M. L.¹, Savchenko Y. A.¹, Kulemin Y. E.¹

¹ Institute of Human Ecology of SB RAS, Leningradsky Ave 10, Kemerovo, 650065, Russian Federation; annateam86@gmail.com;

² Kemerovo State University, Krasnaya St. 6, Kemerovo, 650043, Russian Federation

The frequency and spectrum of chromosome abnormalities in pupils of the boarding school of Tashtagol are investigated, and increased level of chromosomal aberrations are revealed, demonstrating the existence of pronounced genotoxic effects of environmental factors. Correlation between chromosome aberration level and genome dose of active ribosome genes in children living in boarding school in Tashtagol of Kemerovo region and exposing of supernormal radon dose are studied. Genome dose of active ribosomal genes in the study group are analyzed in carriers of medium dose of active ribosome genes the level of chromosome aberration was significantly higher as compared with low and high dose carriers. In conclusion the importance of role of active ribosome genes dose in formation of genotoxic effects of radon influence is emphasized.

Keywords: chromosomal aberrations, ribosome genes, radon.

Геном человека постоянно подвержен воздействию генотоксических и мутагенных факторов, способных нарушить его стабильность и привести к возникновению структурных нарушений, точечных мутаций и, возможно, впоследствии, к апоптозу или злокачественному перерождению клеток.

Одним из сильнейших канцерогенов и мутагенов является радон, к воздействию которого наиболее чувствительны дети и подростки. Кафедрой генетики КемГУ в ходе экспедиционных выездов 2007–2011 годов была выявлена повышенная удельная объемная активность радона в воздухе жилых и учебных помещений школы-интерната г. Таштагол

Кемеровской области [3]. Проведенные исследования частоты и спектра хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах периферической крови подтвердили наличие кластогенных эффектов воздействия повышенных доз радона [3].

В процессах адаптации индивидов к неблагоприятным экологическим условиям важную роль могут играть рибосомные гены, которые контролируют весь биосинтез белка в клетке. В ряде исследований изучалась роль рибосомных генов в процессах адаптации индивидов к неблагоприятным экологическим условиям. Было показано, что появление большого числа хромосом с крупными вариантами Ag-ЯОР можно объяснить компенсаторной активацией резервных копий генов рРНК, имеющихся в отдельных ЯОР, которая подразумевает приспособительное включение адаптивных механизмов и может служить важным фактором поддержания внутриклеточного гомеостаза при стрессовых воздействиях [4].

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы является изучение взаимосвязи дозы активных копий рибосомных генов (АкРГ) на уровень ХА у детей и подростков, подвергающихся воздействию радона.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили препараты лимфоцитов периферической крови 272 детей и подростков, из них 139 мальчиков (средний возраст $12,73 \pm 0,23$ лет) и 133 девочки (средний возраст $13,05 \pm 0,23$ лет), постоянно проживающих и обучающихся в школе-интернате г. Таштагол. В группу сравнения вошло 185 детей и подростков, проживающих в сельских населенных пунктах с отсутствием выраженного загрязнения окружающей среды по радиационным и химическим показателям: с. Красное, с. Пача и с. Зарубино. Средний возраст детей и подростков из группы сравнения составил $13,90 \pm 0,28$ лет у мальчиков (83 человека), у девочек $14,84 \pm 0,25$ года (102 человека). Учитывали четыре основные категории хромосомных aberrаций: хроматидные и хромосомные разрывы (фрагменты); хроматидные и хромосомные обмены.

Активность рибосомных генов оценивали на препаратах хромосом, окрашенных нитратом серебра по методу Howell&Black (1980) с модификациями. Размеры AgЯОР выражали в условных единицах, оценивая их визуально по 5-балльной системе: 0 баллов – окраска отсутствует, 1 – окраска слабая (зерно серебра меньше ширины хроматиды), 2 – средняя окраска (зерно серебра примерно соответствует ширине хроматиды), 3 – интенсивная окраска (зерно серебра больше ширины хроматиды), 4 – зерно серебра намного больше ширины хроматиды. Определяли суммарный показатель всех 10 AgЯОР, для каждого человека анализировали активность ядрышкообразующих районов хромосом в 20 клетках.

Статистический анализ первичных данных осуществляли средствами STATISTICA for WINDOWS v.8.0 и MS Excel 2007. Для исследования использовали методы непараметрической статистики (U-критерий Манна – Уитни для сравнения групп). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Для анализа взаимосвязи дозы активных рибосомных генов с уровнем хромосомных нарушений использовали методы логистической регрессии. Для построения регрессионной модели оценивали пороговый уровень ХА, который позволяет отличать обследованных в когорте, экспонированной радоном, от детей и подростков из группы сравнения. Для вычисления порогового значения уровня ХА проводили анализ ROC-кривых с помощью программы MS Excel 2007. Для минимизации статистической ошибки первого типа вводили поправку на множественность сравнений (поправка Бонферрони).

Результаты

В результате замеров удельной объемной активности радона в жилых и учебных помещениях школы-интерната г. Ташатагол и с. Красное, Пача и Зарубино ранее было выявлено статистически значимое превышение данного показателя в воздухе помещений школы-интерната г. Ташатагол, в среднем уровень составил 479,71 Бк/м³, достигая 1400 Бк/м³ в зимние периоды. В контрольных населенных пунктах все радиологические показатели не превышали нормативных значений.

Исследование частоты и спектра хромосомных нарушений у детей-воспитанников школы-интерната г. Ташатагол демонстрирует существование выраженного генотоксического воздействия факторов окружающей среды (табл.1).

Таблица 1

Хромосомные аберрации в группе детей и подростков, проживающих в г. Ташатагол и контрольной группе

Группа	Доля аберрантных метафаз, %	Число аберраций на 100 клеток			
		фрагменты		обмены	
		одиночные	парные	хроматидные	хромосомные
Дети г. Ташатагол	4,68 ± 0,15*	3,36 ± 0,13*	1,22 ± 0,06*	0,025 ± 0,008	0,21 ± 0,03**
Группа сравнения	2,69 ± 0,11	2,02 ± 0,09	0,63 ± 0,05	0,030 ± 0,009	0,06 ± 0,013

Примечание: * $p < 0,001$; достоверно отличается от значений для группы сравнения; ** $p < 0,01$, достоверно отличается от значений для группы сравнения.

Основной цитогенетический показатель – доля аберрантных метафаз в когорте обследованных из г. Ташатагол статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой ($p < 0.001$). Особое внимание обращает на себя высокая частота встречаемости в опытной группе обменов хромосомного типа, так как именно аберрации данного типа являются хорошим маркером воздействия радиации [2].

В результате анализа дозы АкРГ было выявлено, что среднее значение в исследуемой группе (г. Таштагол) составляет $18,59 \pm 0,10$ баллов, что согласуется с результатами, полученными ранее, для различных возрастных групп Кемеровской области, не подвергавшихся генотоксическим воздействиям [6]. Статистически значимых отличий дозы активных рибосомных генов в зависимости от возрастной и половой принадлежности не выявлено.

С целью выявления взаимосвязи уровня ХА и дозы транскрибируемых рибосомных генов всю выборку детей, подвергающихся воздействию сверхнормативных доз радона, разделили на группы в зависимости от дозы АкРГ. Группы были сформированы исходя из результатов процентильного анализа:

- с низкой дозой АкРГ (33,33 перцентиль), в которую вошли дети и подростки, у которых данный показатель не превышал 18,00 баллов (53 человека);
- со средней дозой активных рибосомных генов (53 человека) – вошли дети и подростки, у которых значение дозы АкРГ было выше 18,00 баллов, но ниже 19,12;
- с высокой дозой АкРГ (66,66 перцентиль) – вошли обследуемые, у которых данный показатель превысил 19,12 баллов (54 человека).

При проведении сравнительного анализа дозы АкРГ и уровня хромосомных aberrаций было выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости хромосомных нарушений у обследуемых со средней дозой, по сравнению с детьми и подростками с низкой и высокой дозой транскрибируемых рибосомных генов (рис. 1).

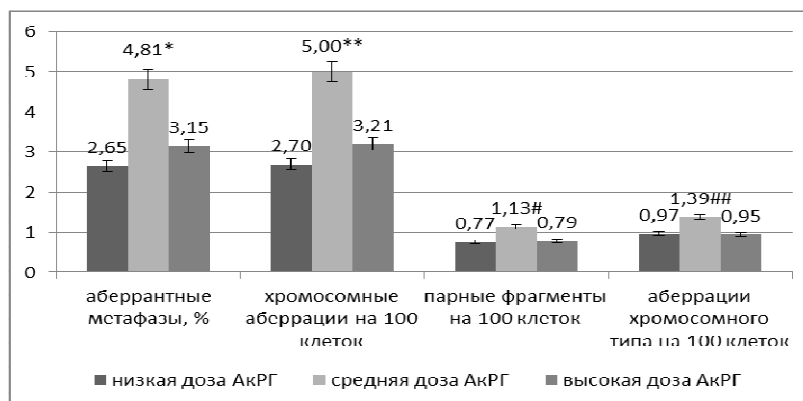


Рис.1. Частота хромосомных aberrаций у детей и подростков с различной дозой активных рибосомных генов

Примечание: * $p < 0,01$, отличие обследованных со средней дозой АкРГ от детей с высокой дозой и низкой дозой; ** $p < 0,01$ отличие обследованных со средней дозой АкРГ от детей с высокой дозой и низкой дозой; # $p < 0,02$, отличие обследованных со средней дозой АкРГ от детей с высокой дозой и низкой дозой; ### $p < 0,02$, отличие обследованных со средней дозой АкРГ от детей с высокой дозой

На следующем этапе исследования группа детей и подростков из г. Таштагол была разделена на две группы в зависимости от уровня ХА. В результате ROC-анализа было

выявлено пороговое значение уровня ХА, равное 3,5 %. Группа с низким уровнем хромосомных нарушений была сформирована из детей и подростков, у которых частота встречаемости хромосомных aberrаций меньше 3,5 %, остальные образовали группу с высоким уровнем ХА.

В ходе исследования было выявлено увеличение частоты встречаемости средней дозы транскрибируемых рибосомных генов в группе лиц с высоким уровнем цитогенетических нарушений (43,56 %) по сравнению с детьми и подростками с низкой частотой встречаемости ХА (26,53 %). Логистический регрессионный анализ выявил наличие положительной ассоциации средней дозы АкРГ с увеличением частоты встречаемости хромосомных нарушений ($OR= 2,14; 0,52 - 8,77; \chi^2=4,91; p=0,027$).

Таким образом, полученные результаты указывают на существование взаимосвязи средней дозы транскрибируемых рибосомных генов и высокого уровня ХА в условиях воздействия повышенных доз излучения радона.

Обсуждение

Полученные в данном исследовании значения уровня хромосомных aberrаций у детей из школы-интерната г. Таштагол, проживающих в условиях воздействия повышенных доз радона, статистически значимо превышают частоту цитогенетических нарушений у их сверстников из группы сравнения. Эти результаты согласуются с данными, полученными в более ранних исследованиях, проводимых в г. Таштагол [3]. Подобные кластогенные эффекты у детей, экспонированных радоном в условиях проживания и обучения в образовательном учреждении интернатного типа, ранее наблюдали исследователи из Словении [8].

Имеются данные о том, что рибосомные гены могут играть роль в процессах адаптации индивидов к неблагоприятным экологическим условиям, например, при воздействии угольной пыли было выявлено увеличение уровня хромосомной нестабильности у лиц с более низкой дозой АкРГ [7]. В другом исследовании, было показано увеличение дозы активных рибосомных генов у рабочих коксохимического производства со стажем свыше 14 лет [6].

Доза АкРГ человека в условиях воздействия повышенного излучения от радона ранее изучена не была. В результате обследования детей г. Таштагол было выявлено, что у носителей средней дозы АкРГ наблюдался самый высокий уровень ХА по сравнению с низкой и высокой дозами. Результаты нашего исследования согласуются с данными, полученными в Курской области, где было показано увеличение частоты встречаемости ХА у лиц со средней дозой АкРГ в условиях спонтанного мутагенеза [1], но остается неясным вопрос о причинах снижения уровня цитогенетических нарушений у носителей низкой дозы

транскрибируемых рибосомных генов. Возможно, данное явление связано с увеличением гибели клеток с поврежденной ДНК. В пользу этого говорят результаты исследования *in vitro*, проведенного на фибробластах кожи при воздействии хромата калия, где наблюдалось увеличение количественных показателей гибели клеток с низкой дозой АкРГ в геноме [5]. Самая низкая частота встречаемости хромосомных поломок была обнаружена у носителей высокой дозы рибосомных генов, что может быть связано с высокой пролиферативной активностью лимфоцитов в клеточной культуре, ведущей к элиминации клеток с ХА, и более интенсивным синтезом ферментов репарации. Несомненно, данные предположения нуждаются в дальнейшей экспериментальной проверке. Тем не менее полученные результаты могут быть использованы при разработке системы прогноза индивидуальной радиочувствительности.

Исследование проведено при финансовой поддержке гранта РФФИ №13-06-98014 р-Сибирь-а и государственного задания Минобрнауки РФ № 2015/ 2162.

Список литературы

1. Амелина И.В., Медведев И.Н. Частота хромосомных aberrаций и активность ядрышкообразующих районов хромосом у человека // *Фундаментальные исследования*. – 2007. – № 1. – С.33-35.
2. Бочков Н.П. Хромосомы человека и облучение. – М.: Атомиздат, 1971. – С.168
3. Дружинин В.Г., Ахматьянова В.Р., Головина Т.А., Волков А.Н., Минина В.И., Ларионов А.В., Макеева Е.А. Чувствительность генома и особенности проявления генотоксических эффектов у детей-подростков, подвергающихся воздействию радона в учебных и жилых помещениях школы-интерната // *Радиационная биология. Радиозэкология*. – 2009. – Т.49. – № 5. – С.568-573.
4. Ляпунова Н. А., Еголина Н. А. Межхромосомный и межиндивидуальный полиморфизм системы рибосомных генов в геноме человека // I Всес. конф. «Геном человека». – М., 1990. – С.170–171.
5. Ляпунова Н.А., Вейко Н.Н. Рибосомные гены в геноме человека: структурно-функциональная организация, фенотипическое проявление и связь с патологией // *Генетика в XXI веке: современное состояние и перспектива развития*. – 2004. – Т.2. – С.12.
6. Минина В.И., Дружинин В.Г. Геномные дозы активных генов рРНК у рабочих коксохимического производства // *Генетика*. – 2004. – Т.40, №12. – С.1702 – 1708.

7. Минина В.И., Дружинин В.Г., Лавряшина М.Б., Карпова В.В., Ахматьянова В.Р. Способ определения индивидуальной чувствительности и профессиональной пригодности лиц для работы в условиях повышенного содержания угольной пыли. Патент РФ. RU 2 316 764 С1. Кл. G 01 N33/48, опубл. 10.02.2008.
8. Bilban M., Vaupoti J. Chromosome aberrations study of pupils in high radon level elementary school / Health Phys. – 2001. – Vol.80, №2. – P.157–163.
9. Howell W.M., Black D.A. // Experia. – 1980. – V.36. – P.1014–1015.

Рецензенты:

Дружинин В.Г., д.б.н., профессор, проректор по научной работе ФГБУН «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово;

Лавряшина М.Б., д.б.н., доцент, профессор кафедры генетики Кемеровского государственного университета, г. Кемерово.