УДК 575.113:575.1/.2:539.16.04

РАДИАЦИОННО ИНДУЦИРОВАННАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕНОМА И ЕЕ НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ОБИТАНИИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО НИЗКОДОЗОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Л. А. Башлыкова

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, РФ,
labashlykova@ib.komisc.ru

Исследована поврежденность генома клеток костного мозга полевок-экономок (*Microtus oeconomus*), обитающих в условиях антропогенно-повышенного уровня естественной радиоактивности в течение более 50 лет, и их поколений (F_1-F_3), выращенных в виварии. Обнаружен повышенный уровень хромосомных аберраций у потомков облученных животных, что свидетельствует о трансгенерационной передаче радиационно индуцированной нестабильности генома (РИНГ). В то же время эти животные более устойчивы к действию химического мутагена уретана. Вероятно, этому способствует перестройка в системе защиты клеток (усиление репарации ДНК, апоптоза поврежденных клеток и т. п.).

Ключевые слова: повышенный фон радиоактивности, РИНГ, устойчивость к мутагену, мышевидные грызуны

В XX веке добыча радиоактивных веществ, испытания ядерного оружия, аварии на объектах атомной промышленности привели к глобальному загрязнению нашей планеты радиоактивными элементами. В результате многие объекты живой природы испытывают хроническое облучение в малых дозах. В отличие от острого облучения, наблюдаемые в области низких доз, генетические эффекты обусловлены не столько повреждающим действием ионизирующего излучения, сколько особенностями реализации ответной реакции клетки на слабые внешние воздействия [1]. Изучение состояния животных при хроническом облучении в диапазоне малых доз ионизирующей радиации выявило неоднозначность геномного ответа, который проявлялся как гиперчувствительность, так и радиорезистентность [2, 3]. Цель нашего исследования – сравнительный анализ спонтанного, радиационно и химически индуцированного изменения частоты хромосомных повреждений в клетках мышевидных грызунов при длительном воздействии ионизирующего излучения в естественной среде обитания, а также у потомков виварного разведения.

Объектом исследования служили полевки-экономки (*Microtus oeconomus* Pall.) и их потомки (F_1-F_3), полученные в условиях вивария. Полевки были отловлены в биогеоценозах с нормальным и повышенным уровнем радиоактивности (Республика Коми, Ухтинский р-н). В условиях загрязнения данной территории подземными радиоактивными водами популяция полевок обитает уже более 50 лет. Содержание ^{226}Ra в почвах радиевого участка на 3 порядка выше кларкового уровня, мощность γ-излучения в настоящее время превышает фоновые значения в 10–300 раз и варьирует в пределах 0,5–12,5 мкГр/ч [4]. Сравнение чувствительности к острому облучению проводили при облучении дозой 3 Гр при мощности дозы γ-излучения 0,75 Гр/мин. Для оценки реакции животных на стандартизованное действие химического мутагена полевкам за два дня до окончания эксперимента внутрибрюшинно вводили 10%-ный раствор уретана, который является промотором опухолей легких (1 мг/г массы тела). Интактные животные получали эквивалентное массе тела количество физиологического раствора. Цитогене-

тические эффекты в клетках костного мозга полевок-экономок определяли по частоте клеток с микроядрами, митотическому индексу и доле элиминирующих клеток по типу программированной гибели – апоптозу [5, 6]. Повреждения на молекулярном уровне оценивали по количеству двунитевых разрывов ДНК с привлечением ДНК-кометного теста [7]. Сравнивали долю (%) мигрировавшей ДНК в хвост кометы, с применением компьютерной программы “Comet Score 1.5” [8].

Хроническое облучение полевок в течение многих поколений вызывает повышение частоты клеток костного мозга с микроядрами в 1,8 раза по сравнению с контрольными животными. Кроме того, у этих животных наблюдается достоверно более низкий митотический индекс, и повышенный в 1,5 раза уровень элиминации клеток (апоптоз). Количество двунитевых разрывов ДНК, у животных с контрольного и радиевого участков не различалось. Цитогенетический анализ F_1-F_3 виварного поколения полевок выявил следующее: Уровень клеток с микроядрами у потомков контрольного участка постепенно увеличивается и стабилизируется на уровне 20 ‰ у 2–3 поколения. У первого-второго поколения полевок радиевого участка частота клеток с микроядрами не отличается от контрольных значений. В F_3 отмечено достоверное повышение частоты МЯ по сравнению с F_3 контроля и по сравнению с предками (Р), что может свидетельствовать о трансгенерационной передаче нестабильности генома от родителей к их потомкам. Количество делящихся клеток к третьему поколению в обеих группах снижается и различия пролиферативной активности клеток костного мозга второго-третьего поколения между контрольными и «радиевыми» полевками нивелируются. Частота апоптозных клеток изменяется синхронно с изменением количества клеток с МЯ – происходит изменение уровня элиминации дефектных клеток в ответ на изменение количества клеток с поврежденным ядром. У первого виварного поколения контрольных полевок обнаружено существенное повышение двунитевых разрывов хромосом. К третьему поколению наблюдается снижение этого типа повреждения ДНК у потомков как контрольного, так и радиевого участков. Более значительное снижение отмечено у потомков животных радиевого участка.

Провокационное острое облучение животных в дозе 3 Гр приводит к достоверному увеличению частоты клеток с МЯ, но их уровень у контрольных животных после острого облучения достоверно выше, чем у полевок радиевого участка. Отметим, что острое облучение контрольных животных вызывает пятикратное увеличение клеток с МЯ, а у полевок радиевого стационара – только в 2,7 раза. Также обнаружен более высокий уровень образования двунитевых разрывов ДНК у полевок контрольного участка. Это может свидетельствовать о большей устойчивости полевок, которые в течение многих поколений (~ 100) обитали в условиях повышенного фона ионизирующего излучения. Снижение пролиферативной активности клеток (МИ) и повышение программированной гибели клеток (апоптоз) свидетельствует об активации системы защиты генома от повреждающих факторов.

Провоцирующее действие уретана выявило разную ответную реакцию животных, обитавших в различных радиоэкологических условиях, а также у их потомков. Введение уретана контрольным животным достоверно увеличивает частоту аберрантных клеток, снижает митотическую активность, резко уменьшает апоптотическую гибель клеток. При воздействии уретана на полевок радиевого участка наблюдается снижение числа клеток с микроядрами и митотической активности. Рассчитанные коэффициенты взаимодействия указывают на антагонистические эффекты сочетанного действия исследуемых факторов для всех исследованных показателей (частота МЯ, МИ и

апоптоз). Более низкие показатели выхода генетических повреждений при воздействии на животных, обитавших на территории с повышенным радиационным фоном, свидетельствуют об их большей устойчивости к уретану. Таким образом, нами обнаружено повышение устойчивости к действию различных факторов (острое обучение и химический мутаген) животных, испытавших длительное воздействие повышенной радиоактивности. Можно предположить, что при длительном обитании популяции полевок-экономок в условиях повышенного радиационного фона происходит перестройка работы системы защиты клеток.

Результаты анализа воздействия уретана на потомков полевок виварного разведения показали, что у первого поколения полевок контрольного участка произошло изменение ответной реакции на мутаген. Микроядерный тест показал повышение их устойчивости к химическому агенту – уретан не привел к повышению частоты клеток с микроядрами. Снижение пролиферативной активности и повышение апоптоза говорят об активации защитных процессов в клетках контрольных животных. Известно, что отлов диких животных и перевод их из естественной среды обитания в условия вивария является для них стрессом. Под его воздействием происходит активация защитных сил организма, позволяющая приспособиться к новым условиям обитания. Она (активация) также способствует повышению устойчивости к химическому мутагену F_1 контрольных животных.

При воздействии уретана на F_1 радиевого участка отмечена та же реакция, что и у их родителей – снижение доли клеток с микроядрами. Поскольку наблюдается значительное увеличение апоптоза, то, вероятно, снижение количества аберрантных клеток обусловлено их повышенной элиминацией. Ответная реакция на воздействие уретана F_2 и особенно F_3 возвращается к исходному (родительскому) типу: у контрольных животных доля клеток с МЯ под воздействием уретана повышается, у «радиевых» - снижается. Это может свидетельствовать о трансгенерационной передаче особенностей защиты генома клеток у животных, длительно обитавших в различных радиоэкологических условиях. Отмечена неоднозначность результатов на клеточном и молекулярном уровнях – по результатам оценки двунитевых разрывов ДНК обнаружена большая чувствительность к уретану потомков облученных животных.

Исследование цитогенетических показателей у животных, длительное время обитавших в различных радиоэкологических условиях, а также у «виварных» потомков выявило следующее:

1. Частота хромосомных повреждений (МЯ) у полевок радиевого участка выше, чем у контрольных животных.

2. Достоверно более высокий уровень МЯ отмечен у их потомков (F3), что может свидетельствовать о трансгенерационной передаче нестабильности генома.

3. Обнаружена повышенная устойчивость к воздействию различных повреждающих факторов (острое обучение и химический мутаген) у животных, испытавших длительное воздействие повышенной радиоактивности.

4. У первого и третьего поколений полевок радиевого участка так же отмечена высокая устойчивость к химическому мутагену, что свидетельствует о трансгенерационной передаче повышенной устойчивости.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН (грант № 0414-2015-0024) и Президиума УрО РАН (№ 15-4-4-20).

1. Евсеева Т. И., Гераськин С. А. (2001) Сочетанное действие факторов радиационной и нерадиационной природы на традесканцию. Екатеринбург: УрО РАН.
2. Ахматулина, Н. Б. (2005) Отдаленные последствия радиации и индуцированная нестабильность генома // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 45(6): С. 680–687.
3. Кузнецова Е. А., Заичкина С. И., Сирота Н. П. и др. (2014) Индукция редко- и плотноионизирующими излучениями повреждений ДНК в лейкоцитах крови и цитогенетических повреждений в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей и их потомков // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 54 (4): С. 341–349.
4. Маслов В. И. (1972) Радиационная обстановка жилищ и убежищ мышевидных грызунов в условиях биогеоценозов повышенной естественной радиоактивности // Радиоэкологические исследования в природных биогеоценозах / Под ред. И. Н. Верховской. М.: Наука, С. 216–226.
5. Hedlle J. A. (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage // Mutation Research. V. 18: P. 187–190.
6. Тронов В. А., Никольская Т. А., Конопляников М. А. и др. (1999) Спонтанная гибель мононуклеарных клеток, полученных от здоровых доноров и больных системной красной волчанкой // Цитология. Т.41 (5): С. 400–404.
7. Singh N. P., McCoy M. T., Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell // Exp. Cell Res. V. 175: P. 184–191.
8. Olive P. L, Banath J. P. (1993) Induction and rejoining of radiation induced DNA single-strand breaks: «tail moment» as a function of position in the cell cycle // Mutat Res. (DNA Repair). V. 294: P. 275–283.

RADIATION INDUCED GENOMIC INSTABILITY AND ITS INHERITANCE UNDER PROLONGED CHRONIC LOW-DOSE RADIATION

L. A. Bashlykova

Institute of Biology of Komi Scientific Centre of Ural Branch of RAS, Syktyvkar, RF,
labashlykova@ib.komisc.ru

Bone marrow cells genome damage was studies in tundra voles (*Microtus oeconomus* Pall.) living under anthropogenic increased level of natural radiation during more than 50 years and this species' generations (F_1-F_3) bred in a vivarium. An increased level of chromosomal aberrations was found in descendants of the exposured animals that indicates transgenerational transmission of radiation induced genomic instability. At the same time, these animals are more resistant to chemical mutagen urethane. This is probably due to alteration in cell protection system (amplification of DNA reparation, apoptosis of damaged cells etc.).

Key words: increased irradiation level, radiation-induced instability, resistance to mutagen, rodents, *Microtus oeconomus*