

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГЕНОТОКСИЧЕСКОМУ ЭФФЕКТУ БЛЕОМИЦИНА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЖИТЕЛЕЙ СЕЛ ЗОНЫ ОТЧУЖДЕНИЯ ЧАЭС

Т. В. Цыганок

*Институт ядерных исследований НАН Украины, Киев*

Для сравнительного определения активности внутриклеточных репаративных систем у людей, проживающих в селах зоны отчуждения ЧАЭС несанкционированно, и жителей сел Яготинского района Киевской области (контрольная группа) исследована чувствительность хромосом лимфоцитов их периферической крови к генотоксическому действию блеомицина *in vitro*. Критерием оценки была частота индуцированных блеомицином хроматидных разрывов на клетку. Выявлена достоверно более высокая чувствительность к блеомицину в группе самоселов зоны отчуждения ЧАЭС за счет реакции клеток лиц моложе 60 лет. Для лиц старше 60 лет достоверных различий не обнаружено.

Ранее нами было выявлено существенное увеличение среднегруппового уровня мутагенеза в лимфоцитах крови людей, длительно проживающих в селах зоны отчуждения ЧАЭС, по сравнению с жителями Яготинского района Киевской области, территория которого не загрязнена выпадениями радионуклидов чернобыльского происхождения [1]. Причем наряду с увеличением аберраций хромосомного типа, являющихся маркерами радиационного воздействия, было обнаружено достоверное повышение аберраций хроматидного типа. Последнее свидетельствует о повышении общей нестабильности генетического аппарата. Известно, что уровни спонтанного и индуцированного мутагенеза обуславливаются, главным образом, активностью внутриклеточных репаративных систем. Простым и показательным, хотя и не прямым тестом, для определения активности репаративных систем является тест чувствительности клеток к генотоксическому действию блеомицина *in vitro*. Наиболее характерным в механизме действия блеомицина является индукция разрывов в нитях молекул ДНК посредством комплекса блеомицина с ионами железа и молекулярного кислорода [2 – 4]. Наличие структурных или функциональных повреждений в ферментативной системе репарации, очевидно, должно проявляться в высокой чувствительности генетического аппарата клеток к блеомицину. Согласно [5, 6], после непродолжительного культивирования лимфоцитов с блеомицином в клетках лиц с дефицитом репарации ДНК обнаруживается повышенная частота хроматидных разрывов. Параллельно высокая чувствительность как к блеомицину, так и радиационному фактору выявлена у лиц, больных атаксией телангэктазией, пигментной ксеродермой [7]. Это наглядно подтверждает информативность теста чувствительности к блеомицину для определения повышенной чувствительности генетического материала к воздействию факторов окружающей среды. Исходя из изложенного, мы сочли целесообразным провести сравнительное исследование чувствительности к блеомицину хромосом лимфоцитов в культуре крови групп жителей зоны отчуждения ЧАЭС и Яготинского района.

### Материалы и методы

Нами обследовано 20 человек (11 мужчин и 9 женщин), самовольно проживающих в селах зоны отчуждения ЧАЭС, расположенных в северо-западном (Старые Шепеличи, Рудня Иллинецкая, Лубянка) и юго-восточном направлениях (Опачичи, Куповатое, Городище) от ЧАЭС. Возрастной диапазон обследованных лиц 27 - 70 лет, среднегрупповой возраст  $56,6 \pm 2,4$ . Плотность загрязнения территорий их проживания  $^{137}\text{Cs}$  74 - 477,  $^{90}\text{Sr}$  33 - 289,  $^{238,239+240}\text{Pu}$  - 1,5 - 10 кБк/м<sup>2</sup>. Эти люди после эвакуации 4 мая 1986 г. вернулись в зону

отчуждения в период с июня 1986 по апрель 1987 г. Для сравнения параллельно были обследованы 22 жителя Яготинского района Киевской области. Группа сравнения была сформирована в соответствии с возрастом и полом самоселов зоны отчуждения ЧАЭС. Никто из них не имел сознательного контакта с радиационным фактором, кроме рутинных рентгенодиагностических процедур, и не подвергался химиотерапии. Климатические и социально-экономические условия и медицинское обслуживание для лиц обеих групп были аналогичны. На момент взятия проб крови никто из обследованных не имел острых и обострения хронических заболеваний, у них не было диагностировано онкозаболеваний.

Пробы венозной крови отбирали в вакуотейнеры с напыленным гепарином; 0,25 мл цельной крови культивировали в 3,0 мл среды RPMI-1640, содержащей 15 % эмбриональной телячьей сыворотки и 1,5 % ФГА-Р (Sigma, США), в течение 72 ч при 37 °С. Через 67 ч инкубации в культуру вносили блеомицин (фармакологический препарат блеомицетина гидрохлорид, Российская Федерация) в конечной концентрации 3 мкг/мл культуры крови. Исходный раствор блеомицина готовили на физрастворе и хранили при -20 °С. За 3 ч до фиксации в культуру добавляли колхицин в конечной концентрации 7,5 мкг/мл для ингибирования митозов. В контрольную культуру добавляли только колхицин. Препараты готовили по стандартной методике [8], используя для гипотонии 75 мМ раствор КСl, для фиксации – смесь этанола и уксусной кислоты (3 : 1), для окрашивания – краску Гимза (4 %-ный раствор в 0,01М фосфатном буфере). Анализ шифрованных препаратов проводили под масляной иммерсией при увеличении  $\times 900$ . От каждого индивидуума анализировали по 100 метафаз, отвечающих необходимым требованиям. Учитывали хроматидные разрывы и хроматидные обмены. Каждый обмен рассматривали как два разрыва. Хроматидные пробелы не учитывали. При анализе метафаз с высокой частотой разрывов установили предел учитываемых разрывов 12, т.е. метафазы с большим числом разрывов считали как с двенадцатью.

Чувствительность к блеомицину лимфоцитов обследованных лиц выражали как среднее число индуцированных хроматидных разрывов на клетку (Р/кл).

Достоверность различий между группами оценивали по критериям Вилкоксона - Манна - Уитни и Стьюдента [9].

### Результаты и обсуждение

Спонтанный уровень Р/кл в необработанных блеомицином лимфоцитах у жителей Яготинского района и у самоселов зоны отчуждения ЧАЭС был низким со средними значениями  $0,026 \pm 0,005$  и  $0,038 \pm 0,007$  соответственно. При этом у большинства лиц значения спонтанных Р/кл были в пределах от 0 до 0,06. Только у одного обследованного из контрольной группы частота Р/кл была 0,1, а в группе самоселов зоны у двух лиц – 0,1 и у трех – 0,07. Низкая спонтанная частота Р/кл в лимфоцитах крови лиц из обеих групп по сравнению с частотой Р/кл в их лимфоцитах после обработки блеомицином позволила нам не учитывать спонтанные показатели при анализе реакции клеток на воздействие блеомицином.

В таблице представлены диапазоны варьирования и среднегрупповые значения ответа на действие блеомицина в обследованных группах жителей зоны отчуждения ЧАЭС и Яготинского района. Сравнение средних показателей как по непараметрическому U-критерию, так и по критерию Стьюдента выявило у самоселов зоны отчуждения достоверное превышение по сравнению с яготинцами средней частоты индуцированных разрывов на клетку ( $p = 0,045$ ) и клеток с большим количеством разрывов – более 12 Р/кл ( $p = 0,003$ ). Встречаемость таких лимфоцитов в крови самоселов была в два раза больше. Профили распределения обследованных лиц в группах по чувствительности лимфоцитов крови к блеомицину представлены на рисунке. В соответствии с предложенным в работе [5] мы использовали среднее значение индуцированных Р/кл плюс одно стандартное отклонение в

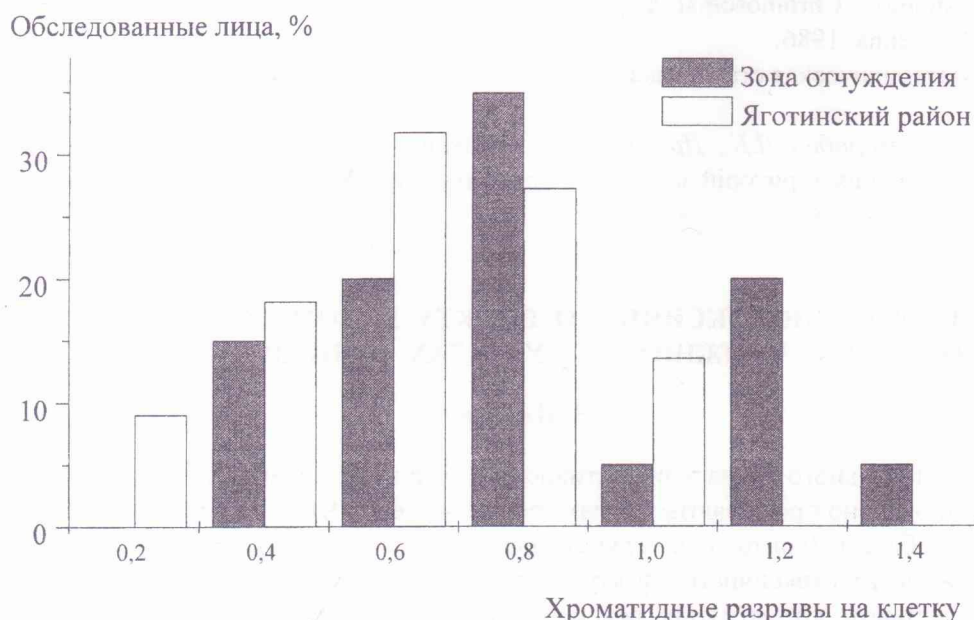
**Чувствительность к блеомицину лимфоцитов крови жителей сел зоны отчуждения ЧАЭС и Яготинского района**

Группа	Число обследованных	Возраст, лет	Хроматидные разрывы на клетку (диапазон, $M \pm m$ )	Клетки с высокой частотой разрывов, % ( $M \pm m$ )
Зона отчуждения ЧАЭС	20	27 - 70 $56,6 \pm 2,4$	0,4 - 1,38 <sup>a</sup> $0,82 \pm 0,06$	<sup>г</sup> $1,20 \pm 0,22$
	11	< 60	<sup>б</sup> $0,88 \pm 0,01$	-
	9	> 60	<sup>в</sup> $0,74 \pm 0,07$	-
Яготинский район	22	26 - 72 $52,1 \pm 2,7$	0,24 - 1,05 $0,66 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,17$
	15	< 60	$0,62 \pm 0,05$	-
	7	> 60	$0,83 \pm 0,06$	-

В сравнении с Яготинским районом: <sup>a</sup>  $p = 0,045$ ; <sup>б</sup>  $p = 0,03$ ; <sup>в</sup>  $p = 0,2$ ; <sup>г</sup>  $p = 0,003$

контрольной группе жителей Яготинского района ( $0,66 + 0,22$ ) как произвольный рубеж для выделения более чувствительных от менее чувствительных лиц к воздействию блеомицина. Лиц, имеющих значения Р/кл 0,7 - 0,9, относили к лицам с пограничной чувствительностью, больше 0,9 – к чувствительным и больше 1,0 – к гиперчувствительным. Исходя из этого, у 35 % самоселов зоны отчуждения ЧАЭС и у 27 % жителей контрольного региона была обнаружена граничная чувствительность к блеомицину, а гиперчувствительный ответ показали 25 % самоселов и 9 % яготинцев.

Поскольку в предыдущих исследованиях показано, что частота цитогенетических повреждений (микроядер [10], суммарных хромосомных повреждений [1]) у жителей зоны отчуждения и лиц групп сравнения достоверно различается только для лиц моложе 60 лет, мы сопоставили также межгрупповую чувствительность к блеомицину с учетом возраста обследуемых людей. Анализ полученных результатов показал, что большая чувствительность к блеомицину в группе самоселов обусловлена также, в основном, за счет лиц моложе 60 лет ( $p = 0,03$ ). При сопоставлении подгрупп из лиц более старшего возраста достоверных различий выявлено не было ( $p = 0,2$ ) (см. таблицу).



Распределение обследованных лиц по чувствительности лимфоцитов к блеомицину.

Т. е. результаты данного тестирования на чувствительность к блеомицину и проведенных нами ранее цитогенетических мониторингов самоселов зоны отчуждения [1, 10] указывают на то, что длительное воздействие низкоинтенсивного надфоновое облучения приводит к снижению активности работы систем репарации, но в то же время позволяют предположить возможность некоторой стимуляции репарационных систем у пожилых людей, угасающих по мере старения их организмов. Однако это предположение требует дальнейшего изучения.

На основании представленного считаем, что тест чувствительности к блеомицину целесообразно использовать как дополнительный тест при биомониторинге популяций людей, проживающих на радиационнозагрязненных территориях, для выявления лиц со сниженной активностью внутриклеточных репаративных систем и прогнозирования реакции генетических структур клеток на низкоинтенсивное облучение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bezdrobna L., Tsyganok T., Romanova O. et al.* Chromosomal Aberrations in Blood Lymphocytes of the Residents of 30-km Chernobyl NPP Exclusion Zone // Recent Research Activities about the Chernobyl NPP Accident in Belarus, Ukraine and Russia / Ed. by T. Imanaka. Res. Reactor Inst. Kyoto Univ. – 2002. – P. 277 - 286.
2. *Iqbal Z.V., Kohn K.W., Ewig A.G., Fornace A.J.* Single strand scission and repair of DNA in mammalian cells by bleomycin // *Cancer Res.* – 1976. – Vol. 36. – P. 3834 - 3838.
3. *Kohn K.W., Ewig R.A.* Effect of pH on the bleomycin-induced DNA single-strand scission in L1210 cells and the relation to cell survival // *Cancer Res.* – 1976. – Vol. 36. – P. 3839 - 3841.
4. *Burger R.M., Peisach J., Horwitz S.B.* Mechanisms of bleomycin action : *in vitro* studies // *Life Sci.* 1981. – Vol. 28. – P. 715 - 727.
5. *Hsu T.C., Johnston D.A., Cherry L.M. et al.* Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis // *Int. J. Cancer.* – 1989. – Vol. 43. – P. 403 - 409.
6. *Hsu T.C., Spitz M.R., Sctantz S.P.* Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Preven.* – 1991. – No. 1. – P. 83 - 89.
7. *Paterson M.C., Smith P.J.* Ataxia telangiectasia: an inherited human disorder involving hypersensitivity to ionizing radiation and related DNA-damaging chemicals // *Ann. Rev. Genet.* – 1979. – Vol. 13. – P. 291 - 318.
8. *Biological Dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment. Technical Reports No. 260, IAEA, Vienna, 1986.*
9. *Урбах В.Ю.* Математическая статистика для биологов и медиков. – М: Изд-во АН СССР. – 1963. – 323 с.
10. *Романова О.П., Бездробна Л.К., Дрозд І.П.* Біоіндикація надфонового опромінення мешканців радіаційно забруднених територій за мікроядерним тестом // *Український радіологічний журнал.* – 2001. – № 9. – С. 63 - 68.

#### ЧУТЛИВІСТЬ ДО ГЕНОТОКСИЧНОГО ЕФЕКТУ БЛЕОМІЦИНУ ЛІМФОЦИТІВ КРОВІ ЛЮДЕЙ, ЯКІ ПРОЖИВАЮТЬ У СЕЛАХ ЗОНИ ВІДЧУЖЕННЯ ЧАЕС

Т. В. Циганок

З метою порівняльного визначення активності внутрішньоклітинних репаративних систем у людей, які несанкціоновано проживають у селах зони відчуження ЧАЕС, і жителів сіл Яготинського району Київської області (контрольна група) досліджено чутливість хромосом лімфоцитів їх периферійної крові до генотоксичного ефекту блеомицину *in vitro*. Критерієм оцінки була частота індукованих блеомицином хроматидних розривів на клітину. Виявлено вірогідно більш високу чутливість до блеомицину в групі самопоселенців зони відчуження ЧАЕС за рахунок реакції клітин людей, молодших 60 років. Для осіб старшого віку вірогідних відмінностей не виявлено.

**SENSITIVITY TO GENOTOXIC EFFECTS OF BLEOMYCIN OF BLOOD LYMPHOCYTES  
OF PEOPLE RESIDING IN VILLAGES OF CHNPP EXCLUSION ZONE****T. V. Tsyganok**

On purpose of comparative determination of cell repair system activity of people residing without permission in the villages of ChNPP exclusion zone and of Yahotyn district, Kiev region (control group) the chromosome sensitivity of peripheral blood lymphocytes to genotoxic effect of bleomycin *in vitro* was studied. Chromatid break frequency per cell was a criterium for the estimation. It was found a significantly higher sensitivity to bleomycin in ChNPP exclusion zone self-settlers' group due to cell reaction of people younger than 60. For the elderly people there was revealed no significant difference.

Поступила в редакцию 02.10.02,  
после доработки – 24.10.02.