

## ФОРМУВАННЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ АНОМАЛІЙ ЗА УМОВ ПРОЛОНГОВАНОЇ ДІЇ НИЗЬКОПОТУЖНОГО ОПРОМІНЕННЯ

О. П. Кравець, Г. Д. Слиявчук, Т. О. Василенко

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

Досліджено специфіку формування хромосомних аберацій в умовах пролонгованого опромінення низької потужності. Показано, що ризик цитогенетичних аномалій для таких умов опромінення може на 1 - 2 порядки бути вищим порівняно до умов гострого опромінення. Обговорюються можливі наслідки хронічного опромінення для реалізації ризиків інших стохастичних радіаційних ефектів – раку та генетичних захворювань.

У сучасних умовах широкомасштабного забруднення довкілля довгоживучими радіонуклідами надзвичайно актуальною стала оцінка ефективності дії на генетичний апарат низькопотужного хронічного опромінення [1]. Чорнобильська аварія ініціювала вивчення ефективності дії малих доз на різних тест-системах та об'єктах, що опромінюються як *in situ*, так і в контрольованих умовах лабораторного експерименту. Виникнення цитогенетичних аномалій є поширеною реакцією організмів на дію техногенного забруднення, включаючи радіонуклідне. Цитогенетичні аномалії є прикладом стохастичних радіаційних ефектів і тому вивчення радіочутливості цього процесу в широкому діапазоні дає інформацію й про інші можливі стохастичні наслідки (рак, генетичні порушення в поколіннях) опромінення в малих дозах. Таким чином, оцінка поведінки цього показника для різних об'єктів є необхідною для вирішення широкого кола як суто теоретичних, так і практичних питань - від надійності використання цитогенетичних тестів у біодозиметрії людини до прогнозування збереження біорозмаїття в умовах підвищеного техногенного навантаження.

Головними результатами дослідження цитогенетичних ефектів малих доз для різних об'єктів у контролюючих умовах стало встановлення атипової, немонотонної поведінки дозової залежності, виявлення явища гіперчутливості при дозах нижче 20 сГр, існування дозозалежного інтервалу та підвищення, порівняно з очікуваною лінійною екстраполяцією, радіорезистентності в області 30 - 50 сГр [2 - 4].

Разом з тим ці дані, одержані в умовах гострого опромінення та короткочасного експерименту, не відображають реакцій на дозове навантаження в біологічних об'єктах *in situ*, коли формування доз, які належать до області малих, відбувається в умовах хронічного опромінення з дуже малою інтенсивністю. Проблема малих доз, що виникла з екологічних негараздів, має два суттєво різних аспекти, пов'язаних з масштабами доз і часом їх формування. Перший аспект полягає у виявленні радіостійкості біологічних об'єктів в області малих доз (і саме це можливо виявити в короткочасних лабораторних експериментах), другий – в оцінці кумулятивних ефектів пролонгованої дії низькопотужного опромінення, що можуть привести до поступової зміни радіочутливості організму у всьому діапазоні доз. Вивчення другого аспекту вимагає розробку специфічних експериментальних моделей та проведення довгострокових експериментів у контрольованих умовах і має супроводжувати натурні оцінки на різних представниках біоти.

У зв'язку з вищенаведеним метою нашої роботи стало вивчення специфіки формування цитогенетичних аномалій та динаміки радіочутливості за умов хронічної дії низькопотужного опромінення.

## Матеріал і метод

В якості експериментальної моделі використовували хронічне опромінення насіння кукурудзи. Використання такого об'єкта має переваги тому, що протягом усього періоду опромінення він знаходиться в одному фізіологічному віці й зміни радіостійкості обумовлюються тільки дією фактора, що досліджується.

© О. П. Кравець, Г. Д. Слиявчук, Т. О. Василенко, 2005



Низькоінтенсивне опромінення сухого насіння відбувалося протягом різного часу (від 2 до 24 міс) та з різною потужністю (10,7 - 155,8 мРн/год). Опромінювали сухе насіння кукурудзи (гібрида та чистої лінії). Протягом опромінення насіння перебувало в плоских паперових пакетах, зафіксованих у концентричних щілинах саморобного штативу з пінопласту, у центрі якого знаходилася пробірка з  $^{137}\text{Cs}$ . Концентричні щілини штативу мають товщину 1,5 см та радіус 2, 5, 8, 11, 14,4 см, що відповідало середній потужності експозиційної дози 155,8, 56,3, 28, 17,5, 10,7 мРн/год. Відзначимо, що саме такий діапазон потужностей дози можна спостерігати на територіях, забруднених унаслідок Чорнобильської аварії. Таким чином, проведено досить адекватне моделювання антропогенно підвищеного радіаційного фону.

Для оцінки відносної ефективності хронічного опромінення та поступових перебудов радіочутливості об'єкта було використано класичні радіобіологічні методи: серійну побудову дозових залежностей проростання та оцінку виходу цитогенетичних ушкоджень. Гостре опромінення насіння в дозах 100 - 300 Гр проводили після 6 год набубнявіння.

Апекси коренів проростків відбирали на 5 добу з моменту проростання та фіксували у фіксаторі Бродського. Через 1 добу зразки відмивали 70 %-ним етиловим спиртом. Мацерація проводилася за допомогою лужного гідролізу 20 %-ного NaOH протягом 28 - 30 хв. Потім препарати 15 хв відмивали дистильованою водою. Фарбування проводили в ацетокарміні протягом 1 доби. Давлені препарати готували за загальноприйнятою методикою.

На кожну дозу використовували по 10 паралельних проб та аналізували по 40 - 50 тис. клітин. Враховуючи специфіку рослинних тканин, визначення хромосомних аберацій проводили за анофазно-телофазним методом. При обробці результатів використовували стандартні методи статистичного аналізу.

В якості додаткового кількісного показника радіочутливості в різному діапазоні доз процесу формування хромосомних аберацій розраховували спонтанні та радіаційні ризики цього процесу на різних етапах експерименту.

Як відомо, радіаційні ризики є розмірною величиною ( $\text{Гр}^{-1}$ ) та є вірогідністю негативного стохастичного ефекту на одиницю дози [5]. Цей показник широко використовується для оцінки та прогнозування різноманітних стохастичних наслідків (рак, спадкові захворювання), до яких належать і хромосомні аберації. В умовах нашого дослідження при розрахунку радіаційного ризику виходили з цілком надійної посилки про те, що процеси спонтанного та радіаційного формування хромосомних аберацій є незалежними і при опроміненні спостерігається адитивний ефект. Радіаційний ризик розраховували за простим співвідношенням

$$R = (P_{\text{rad}} - P_{\text{spon}}) / D,$$

де  $R$  – радіаційний ризик,  $\text{Гр}^{-1}$ ;  $P_{\text{spon}}$  – вірогідність спонтанних хромосомних аберацій (контроль);  $P_{\text{rad}}$  – вірогідність аберацій в умовах досліду при опроміненні в певній дозі.

### Результати та обговорення

У цій статті представлено результати хронічного опромінення насіння гібридного сорту “Пролісок” та одного з його “батьків” – чистої лінії ЮВ-7 протягом 18 та 22 міс, що відповідало нагромадженню дози біля 3 та 4,5 Гр відповідно.

На рис. 1 і 2 наведено дозові залежності проростання двох генотипів в умовах гострого опромінення, що побудовані як для контрольного насіння, так і того, що хронічно опромінювали протягом 18 міс. Як свідчать одержані результати, через декілька місяців експозиції і нагромадження дози біля 3 Гр спостерігається пригнічення проростання у чистої лінії та стимуляція в гібрида за умов відсутності гострого опромінення. Додаткове гостре опромінення у всіх дозах пригнічує проростання в гібрида, а в чистої лінії спостерігається гормезисний ефект при 200 Гр.



При нагромадженні дози біля 3 Гр без додаткового гострого опромінення у проростків спостерігали підвищення міотичного індексу і ця тенденція зберігалась і при додатковому гострому опроміненні гібрида, а для чистої лінії помітної реакції на гостре опромінення не спостерігалось.

Як свідчать дані, наведені в табл. 1, спонтанний вихід хромосомних аберацій є суттєво різний у гібридного сорту та чистої лінії, а довготривале низькопотужне опромінення протягом першого терміну вже приводить до помітного підвищення виходу хромосомних аберацій у чистої лінії.

Суттєво різна поведінка сортів спостерігається й при дії гострого опромінення: вихід хромосомних аберацій при гострому опроміненні в 100 Гр виявляється нижчим у чистої лінії, порівняно з хронічним опроміненням у дозі біля 3 Гр, та значно зростає у гібридного сорту. Такі значні відмінності в біологічній ефективності хронічного та гострого опромінення в рослин одного виду, які опромінювали в сухому

стані та на перших фазах набубнявіння, важко пояснити тільки різною активністю переходу до проростання та ефективністю репараційних процесів. Ключовими моментами цієї відмінності можуть бути різні умови проходження перших біофізичних етапів розвитку радіаційного ураження. Відомо, що при опроміненні як метаболічноактивних тканин, так і сухого насіння підсилюється інтенсивність вільнорадикальних процесів. До моменту набубнявіння зародка та його переходу до активного метаболізму вільні радикали, що утворилися, зафіксовані в мембранному матриксу й тільки потім вони можуть рекомбінувати між собою або виходити в клітинний простір та ушкоджувати ДНК. Який з процесів буде переважати, залежить від взаємодії початкових умов: питомого вмісту ненасичених жирних кислот на клітину, розміру клітини, ступеню відкриття для ушкодження ДНК тощо. В умовах хронічного опромінення у відносно малій дозі, що дає і менший вихід вільних радикалів, процеси рекомбінації, що протікають відповідно закону діючих мас за кінетикою другого порядку, будуть відбуватися з низькою відносною швидкістю, а переважатиме вихід у клітинний простір. Розмір клітин чистої лінії значно менший за клітини гібридного сорту й у цьому випадку процеси ушкодження ДНК вільними радикалами стають більш імовірними. Підтвердженням цієї біофізичної гіпотези, що базується на добре встановлених фактах, є і результати сумісної дії хронічного та гострого опромінення на формування хромосомних аберацій.

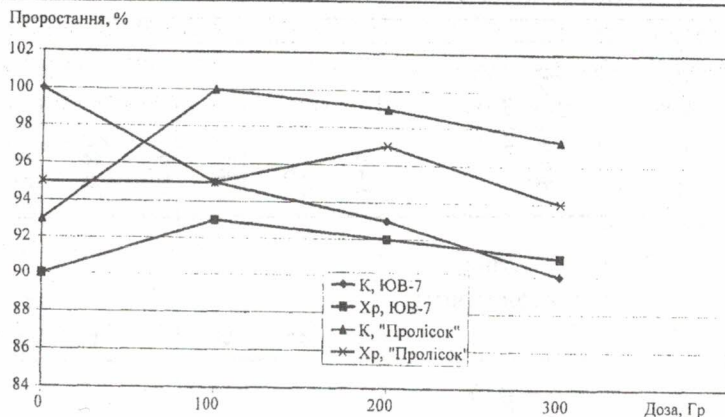


Рис. 1. Вплив хронічного опромінення насіння кукурудзи чистої лінії та гібридного сорту на дозову залежність проростання при гострому опроміненні. Нагромаджена доза 294 сГр.

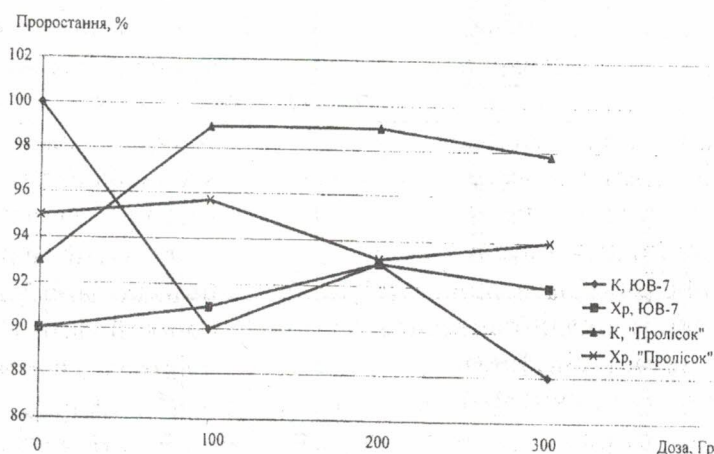


Рис. 2. Вплив хронічного опромінення насіння кукурудзи чистої лінії та гібридного сорту на дозову залежність проростання при гострому опроміненні. Нагромаджена доза 454 сГр.

Таблиця 1. Вихід хромосомних аберацій за різних умов та доз опромінення, %

Варіант	Частота хромосомних аберацій різних типів											Загальний вихід
	К-мітоз	Фрагменти	Мости	Кільцева делеція	Діцентрична делеція	Біполарний мітоз	Взаємна трансляція	Кільцева хромосома	Вагрантна хромосома	Анупіновані ядра		
Контроль "Пролісок"	0,84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,84
Контроль ЮВ-7	2,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,3
Хроніка "Пролісок"	0,81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,81
Хроніка ЮВ-7	15,25	6,25	4	1,25	0	0,93	3,7	0,25	3,7	0	0	37,8
"Пролісок", 100 Гр	10,5	3,7	5,5	0,26	0	0,26	0	0	0	0	0	20,8
ЮВ-7, 100 Гр	5,1	3,1	2,3	0	0	1,8	0,19	0,19	0,19	0,39	0	12,7
"Пролісок", 300 Гр	28	4,1	10,3	0,39	0,19	0,59	0	0,2	0	0,79	0	46,04
ЮВ-7, 300 Гр	10	1,7	3,5	0,29	0	0,58	0	0	0	0	0	16,8
"Пролісок", Хроніка +300 Гр	30,5	4,9	9,8	0,85	0,21	0,85	0	0	0	0,85	0	48,7
ЮВ-7, Хроніка +300 Гр	15,1	1,16	3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	20,6

Примітка. "Пролісок" – гібридний сорт, ЮВ-7 – чиста лінія.



Таблиця 2. Вихід хромосомних аберацій за різних умов та доз опромінення, %

Варіант	Частота хромосомних аберацій різних типів										Загальний вихід	
	К-мітоз	Фрагменти	Мости	Кільцева делеція	Діцентрична делеція	Біполярний мітоз	Взаємна трансляція	Кільцева хромосома	Вагрантна хромосома	Аглютинізовані ядра		
Контроль "Пролісок"	0,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,65
Контроль ЮВ-7	1,7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,7
Хроніка "Пролісок"	9,1	4,1	19,7	0	0	0	0	0	0	0	0	32,8
Хроніка ЮВ-7	7,9	0	2,4	0	0	0	0	0	0	0	0	31,7
"Пролісок", 100 Гр	11,5	6,2	5,5	0	0	0	0	0	0	0	0	22,2
ЮВ-7, 100 Гр	5,8	5,9	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	13,9
"Пролісок", 300 Гр	22	4,1	10,3	0	0	0	0	0	0	0	0	48
ЮВ-7, 300 Гр	12	1,7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	18,9
"Пролісок", Хроніка +300 Гр	20,0	5,7	10	0	0	0	0	0	0	0	0	35,7
ЮВ-7, Хроніка +300 Гр	6,6	1,2	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	10,6

Примітка. "Пролісок" – гібридний сорт, ЮВ-7 – чиста лінія.

Як видно з табл. 1, спостерігаються різні реакції двох сортів і на сполучену дію хронічного та гострого опромінення. Для чистої лінії попереднє хронічне опромінення приводить до суттєвого зниження частоти хромосомних аберацій порівняно з гострим опроміненням. Цей ефект можна пояснити в рамках сформульованої вище біофізичної гіпотези: попереднє хронічне опромінення приводить до окислення ненасичених жирних кислот, тобто до поступового зменшення субстрату для перекисного окислення, що підсилюється гострим опроміненням. Для гібрида не спостерігається такої “терапевтичної” дії попереднього хронічного опромінення і це може бути пов’язано з меншою інтенсивністю перекисного окислення ліпідів, індукованого попереднім хронічним опроміненням.

Розглянемо результати по виходу хромосомних аберацій, одержані на насінні, що опромінювалося протягом 22 міс (табл. 2). Помітно змінився спектр хромосомних аберацій та їх загальний вихід. Найбільш значні зміни спостерігаються в реакції гібридного сорту; вихід хромосомних аберацій значно підвищується й відповідає аналогічному показнику в чистої лінії. Для останнього ж генотипу не спостерігається значних змін у виході хромосомних аберацій.

Проаналізуємо одержані результати, розраховуючи ризики цитогенетичних ушкоджень, тобто вірогідності хромосомних аберацій на одиницю дози. Як видно з табл. 3 спонтанний ризик (частота хромосомних аберацій у контролі) помітно вищий для чистої лінії, ніж для гібрида. Ризик в умовах гострого опромінення для чистої лінії і для гібрида відрізняється несуттєво, але є нижчим, ніж спонтанний ризик. Цей досить несподіваний результат пояснюється тим, що вилучена, як зазначено вище, дія гострого опромінення в дозі 1 Гр визначає менші ушкодження для клітини та макромолекул, ніж комплекс інших ушкоджуючих факторів, що діють на ці системи постійно.

Таблиця 3. Ризики цитогенетичних аномалій при різних дозах опромінення.  
Акумуляція дози 17 міс. Потужність дози 34 мР/ч

Сорт	Спонтанний ризик	Радіаційний ризик цитогенетичних ушкоджень, Гр <sup>-1</sup>		
		Гостре опромінення	Хронічне опромінення	Хронічне + гостре опромінення
ЮВ-7	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$(0,48 - 1,9) \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^{-2}$	$(5,8 \pm 1,2) \cdot 10^{-4}$
“Пролісок”	$0,84 \cdot 10^{-2}$	$(1,5 - 2,4) \cdot 10^{-3}$	на рівні контролю	$(1,5 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$

Таблиця 4. Ризики цитогенетичних аномалій при різних дозах опромінення.  
Акумуляція дози 23 міс. Потужність дози 34 мР/ч

Сорт	Спонтанний ризик	Радіаційний ризик цитогенетичних ушкоджень, Гр <sup>-1</sup>		
		Гостре опромінення	Хронічне опромінення	Хронічне + гостре опромінення
ЮВ-7	$4,7 \cdot 10^{-2}$	$(0,5 - 2,9) \cdot 10^{-3}$	$5,9 \cdot 10^{-2}$	$(3 - 8) \cdot 10^{-4}$
“Пролісок”	$0,65 \cdot 10^{-2}$	$(0,47 - 2,0) \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-2}$	$(5 - 10) \cdot 10^{-4}$

В умовах хронічного опромінення цей показник на два порядки є вищим для чистої лінії. Результат сумісного впливу хронічного й гострого опромінення (табл. 3 і 4) свідчить про те, що для гібрида не спостерігаються будь-які перебудови в радіочутливості процесів, що визначають рівень цитогенетичних ушкоджень, а для чистої лінії – попередній вплив хронічного опромінення приводить до суттєвого підвищення радіостійкості в умовах гострого опромінення.

Ці результати свідчать, що навіть у представників одного виду рослин може бути досить різноманітна реакція на опромінення різної потужності, а ефективність хронічного опромінення може бути на 1 - 2 порядки вища за ефективність гострого опромінення.

Таким чином, використання традиційного підходу до оцінки та прогнозування стохастичних наслідків опромінення у малій дозі, що формується внаслідок забруднення довкілля,



може зіштовхнутися з рядом невизначеностей. По-перше, як безпосередньо свідчать одержані результати, ризик стохастичних ефектів може виявитися значно вищим, ніж за умов гострого опромінення. По-друге, пролонговане опромінення з низькою потужністю може привести до зміни радіочутливості, а формально – до змін коефіцієнтів ризику. Ці зміни можуть мати різну направленість – як у бік підвищення радіостійкості, так і в бік радіосенсибілізації організму. Відомо, що відповідно до закону Сельє при розвитку адаптивного синдрому його останньою фазою може бути виснаження організму [6].

У цьому випадку виникає можливість того, що динаміка прояву різних форм раку та спадкових захворювань значною мірою буде змінена. Таким чином, питання про те, чи відрізняється ефективність дії на генетичний апарат опромінення в малих дозах від гострого опромінення, потребує дослідження з використанням різноманітних експериментальних моделей у контрольованих умовах.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Виленчик М.М.* Радиобиологические эффекты и окружающая среда. - М.: Энергоатомиздат, 1991. - 160 с.
2. *Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н., Спирин Е.В.* Влияние раздельного радиоактивного и химического загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя // Радиационная биология. Радиозэкология. - 2002. - Т. 42, № 4. - С. 364 - 368.
3. *Гераськин С.А., Дикарев В.Г., Дикарева Н., Спирин Е.В.* Влияние сочетанного радиоактивного и химического (тяжелые металлы, гербицид) загрязнения на выход цитогенетических нарушений в интеркалярной меристеме ярового ячменя // Там же. - 2002. - Т. 42, № 4. - С. 369 - 383.
4. *Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Насонова Е.А. и др.* Цитогенетические эффекты малых доз облучения в клетках млекопитающих: Анализ феномена гиперчувствительности и индуцированной радиорезистентности // Там же. - 2002. - Т. 42, № 3. - С. 369 - 383.
5. *Радиация. Дозы, эффекты, риск.* - М.: Мир, 1988. - 78 с.
6. *Новосельцев В.Н.* Теория управления и биосистемы. Анализ сохранительных свойств. - М.: Наука, 1978. - 319 с.

#### ФОРМИРОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ В УСЛОВИЯХ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ОБЛУЧЕНИЯ С НИЗКОЙ МОЩНОСТЬЮ ДОЗЫ

**А. П. Кравец, Г. Д. Слинявчук, Т. А. Василенко**

Исследована специфика формирования хромосомных aberrаций в условиях пролонгированного облучения низкой мощности. Показано, что риск цитогенетических аномалий для таких условий облучения может быть на 1-2 порядки выше, чем в условиях острого облучения. Обсуждаются возможные последствия хронического облучения для реализации рисков других стохастических радиационных эффектов – рака и генетических заболеваний.

#### FORMATION OF CYTOGENETIC ANOMALIES AT THE CONDITION OF PROLONGED EXPOSURE WITH LOW DOSE RATE

**A. P. Kravets, G. D. Slinyavchuk, T. A. Vasilenko**

The properties of chromosomal aberration formation on condition of prolonged exposure had been investigated. It is demonstrated that risk of cytogenetic anomalies on condition of prolonged exposure may be in 1-2 order higher than one for the condition of acute exposure. Possible consequences of prolonged exposure for realization of cancer and genetic risks had been discussed.

Надійшла до редакції 22.07.04,  
після доопрацювання – 20.01.05.