

УДК 575.224.4; 575.1

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕННОСТИ ДНК И РЕПАРАЦИИ У ЖИТЕЛЕЙ П. ДОЛОНЬ С ПОМОЩЬЮ COMET-TEST

Чердниченко О.Г., Пилюгина А.Л.

Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Представлены результаты исследования степени поврежденности ДНК в лимфоцитах периферической крови у жителей п. Долонь (Семипалатинский регион, Восточно-Казахстанская область). Анализировали спонтанный уровень, после *in vitro* воздействия γ -излучения в дозе 1 Гр и оценку эффективности репарации через 2,5 часа после облучения. Также проведено цитогенетическое исследование спонтанной частоты хромосомных aberrаций и радиочувствительности при дополнительном радиационном воздействии. Показано значительное увеличение степени поврежденности ДНК и цитогенетических нарушений у жителей п. Долонь по сравнению с контролем при исследовании спонтанного уровня. Эффективность репарации, определенная с помощью *comet-test* и радиочувствительность на основе цитогенетического анализа при дополнительном облучении клеток обследуемых, варьировала в значительных пределах у разных индивидуумов. Эти параметры у конкретных индивидуумов могут иметь большое значение для индивидуальной ретроспективной оценки доз при остром или хроническом облучении, или при проживании в радиоконтаминированных регионах. Сравнительный анализ данных, полученных используемыми методами, выявил достоверную положительную корреляцию между спонтанной частотой хромосомных нарушений и эффективностью репарации.

При изучении механизмов лучевого поражения клеток немаловажное значение имеет восстановление их жизнеспособности, которое обусловлено явлением репарации ДНК, осуществляемой специальной системой ферментов. Эффективность репарации ДНК, по современным представлениям, имеет определяющее значение в клеточной адаптации к мутагенным факторам, и степень ее функционирования также вносит свои коррективы при ретроспективной оценке дозы [1].

Comet-test активно применяется для оценки степени повреждения ДНК под воздействием каких-либо факторов. Данный метод позволяет измерять гетерогенность клеток на облучение, выделять чувствительные и резистентные субпопуляции, определять степень поврежденности и репарации ДНК в разных фазах клеточного цикла, при воздействии генотоксических агентов, осуществлять биомониторинг окружающей среды [2–6]. К тому же, данный метод позволяет исследовать процесс репарации – после воздействия со временем происходит с одной стороны деградация ДНК, которая в электрическом поле почти полностью мигрирует из головы комет в хвост, с другой стороны – восстановление поврежденного генома.

Задача исследований состояла в том, чтобы оценить спонтанный уровень поврежденности генома в клетках периферической крови людей, проживающие на радиоконтаминированных территориях ВКО, а также оценить эффективность репарации, т.е. степень восстановления поврежденной ДНК после *in vitro* облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы периферической крови для исследований были взяты от 35 человек из п. Долонь (Семипалатинский регион, ВКО).

Радиационная обработка. Образцы цельной крови обследуемых в пластиковых флаконах облучали γ -квантами в дозе 1 Гр на аппарате дистанционной лучевой терапии с кобальтовым зарядом «Терагам» (НИИ онкологии и радиологии, Алматы, Казахстан) с номинальной энергией ускоренных электронов 1,5 МэВ с мощностью доз 0,1 Гр/мин.

Метод «ДНК-комет» основан на электрофорезе ДНК индивидуальных клеток в постоянном электрическом поле. При использовании этого метода геном отдельных клеток во флуоресцентном микроскопе представляется в виде электрофоретического следа. Длина следа и доля в нём ДНК связаны с поврежденностью клеточной ДНК. Уровень разрывов ДНК, определяемых этим методом, оценивается по увеличению количества ДНК, мигрировавшей из клетки, и расстояние ее миграции при электрофорезе иммобилизованных в агарозу единичных клеток [7]. После электрофореза сайды слегка подсушивали и фиксировали в 96 %-ном этаноле в течение 10 мин. Для окраски ДНК использовали SYBR Green. Окраску проводили в течение 10 мин в полной темноте. Микроскопический анализ полученных препаратов проводили под флуоресцентным микроскопом с увеличением $\times 200$ – $\times 400$. Для изучения спектра повреждений была использована градация по количеству деградированной ДНК [8], представленная на рисунке 1.

Степень поврежденности ДНК выражали как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле: $I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \sum$, где: n_0 – n_4 – число «ДНК-комет» каждого типа, \sum – сумма подсчитанных «ДНК-комет».

Оценивали степень повреждения ДНК спонтанного уровня облученных клеток (1 Гр γ -излучения) и степень ее восстановления через 2,5 часа после облучения.

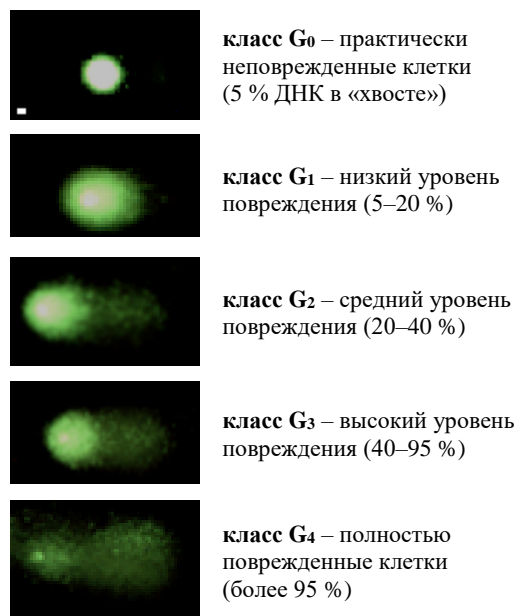


Рисунок 1. Различная степень деградации ДНК в СОМЕТ-ТЕСТ

Культивирование лимфоцитов человека и приготoвление препаратов: к 0,5 мл периферической крови добавляли к 4,5 мл среды культивирования, состоящей из 80 % среды HAMs или RPMI-1640 с глутамином (2 мМ), 20 % сыворотки КРС, пенициллина 100 ед./мл, стрептомицина 100 ед./мл. Деление лимфоцитов стимулировали 2 % ФГА. Клетки инкубировали при 37 °С в течение 48 часов. Для накопления метафазных пластинок в культуральную среду за 2 часа до фиксации вводили колхицин в конечной концентрации 0,8 мкг/мл. Далее клетки гипотонизировали 0,075 М КС1 при 37 °С 15 минут, фиксировали смесью метиловый спирт/ледяная уксусная кислота (3/1) и окрашивали 4 % раствором красителя Гимза [8].

При анализе метафазных пластинок определяли число клеток с абберациями, а также число и тип аббераций на 100 проанализированных метафаз.

Полученные данные обрабатывали статистическими методами [9]. Статистический анализ проводили стандартными методами вариационной статистики [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований по оценке степени поврежденности ДНК у жителей п. Долонь (спонтанный уровень, после *in vitro* облучения в дозе 1 Гр и эффективность репарации) представлены в таблице 1.

Полученные результаты по обследованию методом *comet-test* жителей п. Долонь показали, что спонтанный индекс ДНК-комет у них варьирует от 0,3 до 1,05 ($\Sigma - 0,54$). У здоровых доноров он составляет 0–0,09. При этом класс повреждений 3 и 4 встречался в единичных случаях. Облучение клеток дозой 1 Гр

γ -излучения привело к значительному увеличению показателя поврежденности ДНК- классы G₀ и G₁ практически не встречались. Основная масса клеток была представлена G₃ и G₄ классами, и соответственно индекс ДНК-комет варьирует 1,6–3,3 ($\Sigma - 2,33$). Оценка репарации с помощью этого метода, проведенная через 2,5 часа после ионизирующего воздействия, выявила существенное снижение индекса повреждения ДНК до 0,59–1,79 ($\Sigma - 1,14$). Также был использован критерий «эффективность репарации» – это % не репарированных (не исправленных) нарушений, которые остались через 2,5 часа после облучения, т.е. после работы системы репарации по сравнению с показателями повреждения ДНК через 0,5 часа после облучения. Эффективность репарации у разных индивидуумов варьировала в значительных пределах от минимального в 89 % до максимального 28 %.

Таблица 1. Исследование поврежденности ДНК у жителей п. Долонь в *comet-test*

Шифр	Спонтанный уровень	Облучение 1 Гр γ -излучения	Репарация
1	0,827	2,516	0,757
2	0,288	2,115	0,591
3	0,472	2,424	1,215
4	0,729	2,250	1,111
5	0,481	1,847	0,800
6	0,630	2,321	0,777
7	0,570	2,206	1,017
8	1,051	2,256	1,286
9	0,930	2,047	1,075
10	0,648	1,571	1,155
11	0,277	1,646	0,800
12	0,459	1,872	1,077
13	—	1,859	1,056
14	0,281	1,986	0,696
15	0,494	1,876	1,014
16	0,422	2,180	0,940
17	0,569	2,313	0,800
18	0,561	1,729	1,039
19	0,647	2,259	0,943
20	0,597	2,343	1,455
21	0,300	2,304	1,105
22	0,385	2,754	1,169
23	0,505	2,781	1,145
24	0,766	2,317	1,034
25	0,526	2,478	1,186
26	0,836	2,845	1,444
27	0,277	3,074	1,361
28	0,731	2,867	1,793
29	0,360	2,877	1,333
30	0,519	3,029	1,280
31	0,577	2,600	—
32	0,871	2,333	1,661
33	0,410	3,302	1,385
34	0,517	1,303	1,164
35	0,564	2,400	1,180
Σ	0,544	2,334	1,14

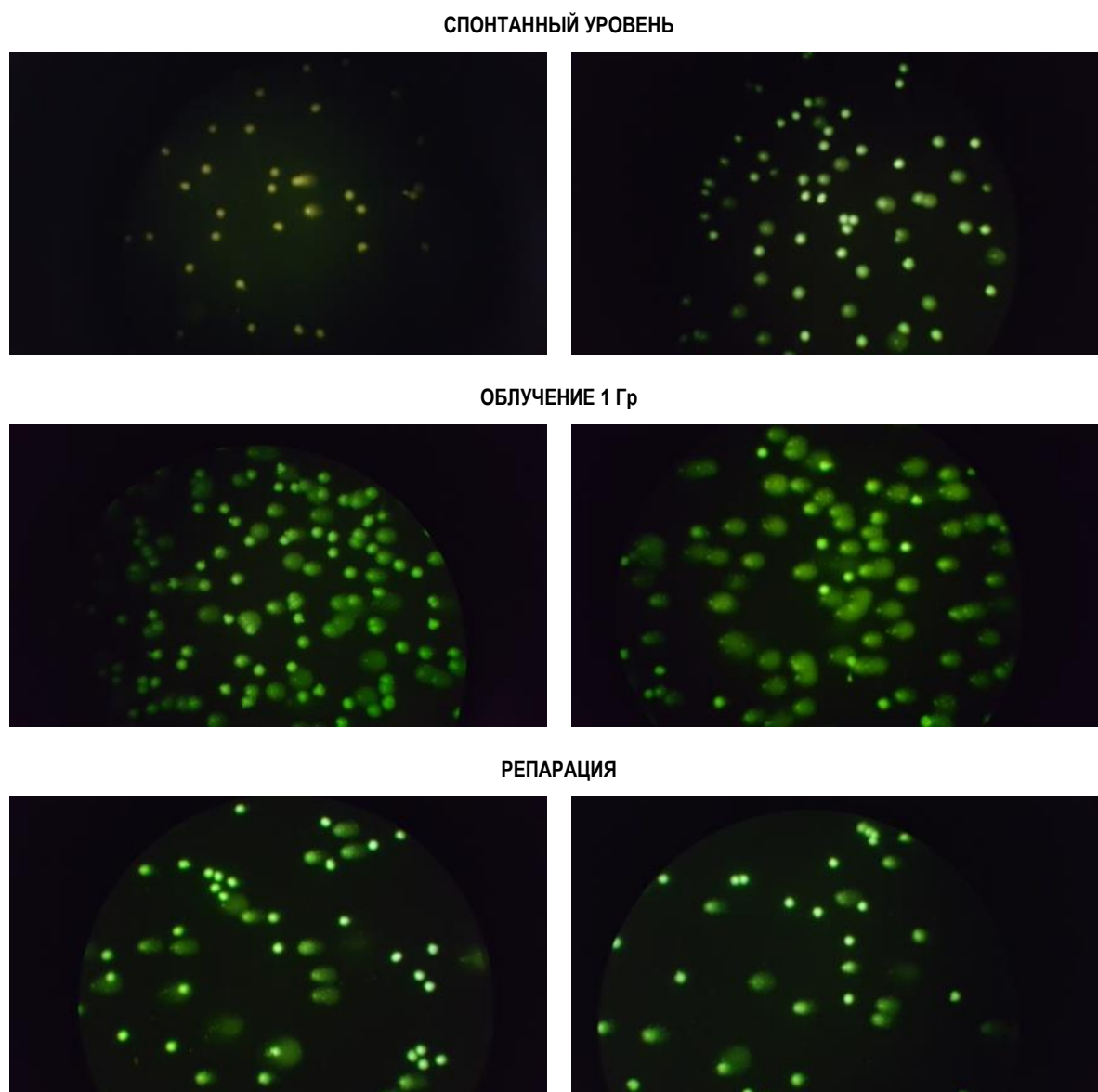


Рисунок 2. Фото препаратов при изучении поврежденной ДНК методом comet-test

Таким образом, эффективность репарации ДНК конкретного индивидуума может иметь большое значение при индивидуальной ретроспективной оценке полученной дозы при остром или хроническом облучении.

На рисунке 2 представлены фото препаратов, демонстрирующих спонтанный уровень повреждений ДНК, после облучения в дозе 1 Гр и эффективность репарации, через 2,5 часа после облучения.

Параллельно проведено цитогенетическое исследование людей, проживающих в п. Долонь и после *in vitro* облучения их крови дозой 1 Гр (таблица 2). Сравнительный анализ по типам aberrаций с контрольными данными (п. Таукаратурык) [11] показал, что спонтанная частота aberrаций хроматидного типа у жителей п. Долонь находится практически на уровне контроля, однако частота aberrаций хромо-

сомного типа превышает его в 10 раз, что свидетельствует об основном влиянии факторов радиационной природы. Индивидуальные колебания частот хромосомных aberrаций составили 1–7 %. Систематизация частоты хромосомных aberrаций у обследованных жителей п. Долонь показала, что только у 14 % обследованных частота выявленных нарушений не превышала общепопуляционного спонтанного уровня для Казахстана, у 77 % она оказалась повышенной и у 9 % – высокой. В общей сложности у 86 % обследованных частота хромосомных aberrаций превышала спонтанный уровень в 2–5 раз. Aberrации хромосомного типа были представлены двойными разрывами и фрагментами, дицентриками и транслокациями, хроматидного типа – одиночными разрывами и фрагментами.

Таблица 2. Цитогенетическое обследование и изучение радиочувствительности лимфоцитов людей, проживающих в п. Долонь

№	Клеток с абберациями (%)	Всего аббераций (%)	Хромосомного типа (%)					Хроматидного типа (%)
			всего	дицентрики	кольца	транслокации	разрывы, фрагменты, обмены	
Сп. ур.	2,79±0,14	2,83±0,15*	1,96±0,12*	0,046±0,02	0,25±0,04	0,046±0,02	1,62±0,11	0,87±0,082
к	0,87 ±0,13	0,87 ±0,13	0,19±0,05			0,06±0,03	0,13±0,05	0,68±0,09
1 Гр	12,8±0,29	14,2±0,30	12,8±0,29	2,48±0,13	2,57±0,14	0,37±0,05	7,4±0,23	1,4±0,10
1 Гр к	15,0±0,80	17,0±0,84	15,0±0,80	3,0±0,36	2,0±0,31	1,0±0,22	9,0±0,64	2,0±0,31

Примечания: 1) к – контроль (п. Таукаратурык, 45 человек)
2) * $p \leq 0,01$

Цитогенетическое обследование 32 жителей п. Долонь, проведенное нами в 1996 году [12], выявило 3,2±0,23 % хромосомных аббераций, из которых 2,4±0,19 % составляли абберации хромосомного типа, а 0,8±0,11 % – хроматидного, что свидетельствует об отсутствии принципиальных различий между данными, полученными с разницей в 20 лет ($p \geq 0,05$).

В большинстве мониторинговых исследований негативное влияние средовых факторов оценивается лишь по частоте хромосомных аббераций, не учитывая нарушений других генетических функций клеток. Исходя из этого, было изучено состояние радиочувствительности у людей, хронически подвергающихся радиационному воздействию в связи с местом проживания.

Радиочувствительность жителей п. Долонь также была исследована путем дополнительного *in vitro* облучения лимфоцитов их периферической крови 1 Гр γ -излучения на G_0 стадии клеточного цикла (таблица 2). У отдельных индивидуумов она варьировала в значительных пределах – частота аббераций составила от 7,5 до 22 %. Радиочувствительность жителей п. Долонь при использовании дозы 1 Гр исходя из частоты хромосомных аббераций в среднем по группе, была достоверно ниже 13,57±0,40 %, чем у здоровых доноров 17,0±8,4 %, ($p \leq 0,01$), что свидетельствует об адаптированности обследуемого контингента людей. При этом развитие радиорезистентности при дополнительном *in vitro* облучении фиксировалось почти у 40 % обследуемых, радиосенсибилизация развилась только у одного человека. Анализ спектра хромосомных аббераций выявил, что при облучении лимфоцитов жителей дозой 1 Гр γ -излучения законо-

мерно в подавляющем большинстве образуются абберации хромосомного типа, в то время как частота аббераций хроматидного типа находится на уровне спонтанных данных. Частота аббераций на одну абберантную клетку составила 1,1. При этом клетки содержали множественные абберации обменного характера.

При сравнении результатов цитогенетического анализа (спонтанный уровень хромосомных аббераций, нарушений, индуцируемых дозой 1 Гр γ -излучения) и результатов *comet-test* ($I_{ДНК}$) у жителей п. Долонь выявлена взаимосвязь этих показателей (корреляция +0,60 $n = 35$, $\beta \geq 0,999$ при спонтанном уровне, и +0,57 $n = 35$, $\beta \geq 0,99$ при *in vitro* воздействии 1 Гр γ -излучения). Также наблюдается достоверная положительная корреляция (+0,52 $n = 35$, $\beta \geq 0,99$) между спонтанной частотой хромосомных нарушений и эффективностью репарации.

Полученные данные согласуются с данными ряда исследований показавших, что при действии γ -лучей в дозе 1 Гр на клетки человека регистрируется (из расчета на диплоидный геном) образование примерно 3–6 разрывов хромосом (определяемых методом преждевременной конденсации интерфазного хроматина), 20–60 двунитевых разрывов, около 200–400 локальных множественных (кластерных) повреждений, 800–1000 однонитевых разрывов, 150 ДНК-белковых сшивков и более 2500 повреждений оснований ДНК (включая модификацию оснований и их отщепление из ДНК [13]). Кроме того, некоторые авторы полагают, что повреждения ДНК (такие как двунитевые разрывы) могут служить сигналом (триггером) для повышения радиорезистентности клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- Газиев А.И. Низкая эффективность репарации критических повреждений ДНК, вызываемых малыми дозами радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 5. – С. 512–529.
- Сирота Н.П., Кузнецова Е.А. Применение метода “Комета тест” в радиобиологических исследованиях // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010 – Т. 50, № 3. – С. 329–339.
- Рябченко Н.Н., Антошина М.М., Насонова В.А. и др. Абберации хромосом в лимфоцитах человека при различной продолжительности культивирования после облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т. 44, № 2. – С. 146–150.
- Cerqueira E.M., Gomes-Filho I.S., Trindade S., Lopes M.A., Passos J.S., Machado-Santelli G.M. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies // Mutat. Res. – 2004. – Vol. 562, № 1–2. – P. 111–117.

5. Godderis L., Aka P., Mateuca R., Kirsch-Volders M., Lison D., Veulemans H. Dose-dependent influence of genetic polymorphisms on DNA damage induced by styrene oxide, ethylene oxide and gamma-radiation // *Toxicology*. – 2006. – Vol. 219, № 1–3. – P. 220–229.
6. Struwe M., Greulich K.O., Suter W., Plappert-Helbig U. The photo comet assay – A fast screening assay for the determination of photo genotoxicity *in vitro* // *Mutat. Res.* – 2007. – Vol. 632, № (1–2). – P. 44–57.
7. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 15 с.
8. Struwe M., Greulich K.O., Suter W., Plappert-Helbig U. The photo comet assay-A fast screening assay for the determination of photo genotoxicity *in vitro* // *Mutat. Res.* – 2007. – Vol. 632, № (1–2). – P. 44–57.
9. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungerford D.A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // *Experimental Cell Research*. 1960. – Vol. 20. – P. 613–616.
10. Плохинский Н.А. Алгоритмы в биометрии. – М.: МГУ, 1967. – 82 с.
11. Губицкая Е.Г., Чередниченко О.Г., Байгушикова Г.М., Ахматуллина Н.Б. Цитогенетический статус жителей Алматинской области // *Вестник Каз. НУ им. аль-Фараби. Серия биологическая*. – 2007. – № 2. – С. 86–90.
12. Губицкая Е.Г., Ахматуллина Н.Б., Всеволодов Э.Б., Вишневская С.С., Шарипов И.К. Частота aberrаций хромосом у жителей районов, прилегающих к Семипалатинскому испытательному ядерному полигону // *Генетика*. – 1999. – № 6. – С. 842–846.
13. Zakeri F., Hirobe T.A. Cytogenetic approach to the effects of low levels of ionizing radiations on occupationally exposed individuals // *European Journal of Radiology*. – 2010. – Vol. 73, I. 1. – P. 191–195.

СОМЕТ-ТЕСТ АРҚЫЛЫ ДОЛОН АУЛЫНЫҢ ТҰРҒЫНДАРЫНЫҢ ДНҚ ЖӘНЕ РЕПАРАЦИЯ ЗАҚЫМДАНУЫНЫҢ КӨРСЕТКІШТЕРІНЕ БАҒА БЕРУ

О.Г. Чередниченко, А.Л. Пилюгина

ҚР БҒМ ҒК Жалпы генетика және цитология институты, Алматы, Қазақстан

Долон аулының тұрғындарының перифериялық қан үлгілерінің лимфоциттеріндегі ДНҚ зақымдану дәрежесінің көрсеткіші келтірілген (Семейөңірі, Шығыс-Қазақстан облысы). *In vitro* жағдайында 1 Гр дозасымен γ -сәулеленуден кейінгі спонтанды көрсеткіштерге талдау жасалды және сәулеленуден 2,5 сағаттан кейін репарация тиімділігіне баға берілді. Бұдан басқа да қосымша радиациялық сәулелену кезіндегі спонтанды хромосомдық aberrациялардың кездесу жиілігіне цитогенетикалық талдау жүргізілді. Бақылау тобында кездескен спонтанды көрсеткішпен салыстырған кезде, Долон тұрғындарында ДНҚ зақымдану және цитогенетикалық бұзылулар көрсеткіші жоғары болды. *Comet-test* арқылы анықталған репарацияның тиімділігі және радиосезімталдығы цитогенетикалық талдау негізінде зерттелушілердің жасушаларын қосымша сәулелендіргенде адамдарда көрсеткіштер дәрежесі әртүрлі болып ауытқиды. Бұл параметрлер жіті немесе созылмалы сәулеленуге, жеке ретроспективті дозасына баға беруге немесе радиосәулеленумен жанасатын өңірлерде тұратын жеке тұлғаларда ерекше орынға ие болуы мүмкін. Әдістемелерді қолдана отырып, алынған нәтижелерге салыстырмалы талдау жасау жүргізгенде спонтанды хромосомдық бұзылулар жиілігі мен репарацияның тиімділігі арасында оң корреляция бар екендігі байқалды.

ASSESSMENT OF THE DEGREE OF DNA DAMAGE AND REPAIR RESIDENTS DOLON WITH COMET-TEST

O.G. Cherednichenko, A.L. Pilyugina

Institute of General Genetics and Cytology, CN, MES RK, Almaty, Kazakhstan

The results of a study of the degree of DNA damage in peripheral blood lymphocytes in residents of Dolon (Semipalatinsk region, East Kazakhstan region) are presented. The spontaneous level was analyzed after *in vitro* exposure to γ -radiation at a dose of 1 Gy and the assessment of the efficiency of repair 2.5 hours after irradiation. A cytogenetic study of the spontaneous frequency of chromosomal aberrations and radiosensitivity with additional radiation exposure was also conducted. A significant increase in the degree of DNA damage and cytogenetic disorders in the inhabitants of the Dolon pod was shown compared with the control in the study of the spontaneous level. The repair efficiency, determined using a *Comet-test* and radiosensitivity based on cytogenetic analysis with additional irradiation of the cells of the patients, varied significantly within different individuals. These parameters in specific individuals may be of great importance for individual retrospective dose assessment during acute or chronic exposure or when living in radiocontaminated regions. A comparative analysis of the data obtained using the methods used revealed a significant positive correlation between the spontaneous frequency of chromosomal abnormalities and the efficiency of repair.