

**АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ИНСТИТУТ РАДИОБИОЛОГИИ**

УДК:612.014.482.4:575.155]:575.16

НИКОЛАЕВИЧ Лариса Николаевна

**ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ
НА НЕКОТОРЫЕ СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА И
ЖИВОТНЫХ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

03.00.01 - Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Минск - 1996.

Работа выполнена в Институте радиобиологии АН Беларуси

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор А. П. Амвросьев

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. АМН
России Г. И. Лазик

доктор биологических наук, старший научный
сотрудник И. В. Мосса

Оппонирующая организация:

Минский государственный медицинский институт

Защита состоится "___" _____ 1996 года в ___ часов
на заседании совета по защите диссертаций Д 01.35.01. в
Институте радиобиологии АН Беларуси (220600, г. Минск,
ул. Жодинская, 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
радиобиологии АН Беларуси.

Автореферат разослан "___" _____ 1996 года.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат биологических наук.

А. М. Ходосовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема малых доз ионизирующих излучений (ИИ) является одной из важных в современной радиобиологии. Особую актуальность она приобрела в связи с аварией на Чернобыльской АЭС, в результате которой, как теперь известно, низкие мощности ионизирующей радиации превратились в постоянный фактор окружающей среды на огромных территориях Беларуси и сопредельных с ней государств. Это обстоятельство явилось основной причиной, привлекая внимание многих исследователей к теоретическим и практическим аспектам хронического действия ИИ на живые системы. Вместе с тем решение проблемы оказалось наиболее трудной, прежде всего, в методическом отношении, а полученные в ходе её разработки данные - противоречивыми (Коггл, 1986; Виленчик, 1991 и др.).

В этом плане возникает необходимость более широкого привлечения комплексных методов исследования, в которые включаются как цитогенетические, так и клональные методы анализа соматических клеток человека и животных. Особо важное значение приобретают исследования состояния клеточных структур развивающегося организма в эмбриогенезе, как более чувствительного по сравнению с постнатальным онтогенезом (Лягинская, 1983; Палыга и др. 1984; Москалев, 1991; Румянцева, Наунич, 1996; Koppermann, 1982; Streffer, Molls, 1984; OECD, 1988; Lazjuk et al., 1994 и др.).

Учитывая сказанное, нами проведены исследования действия радиационного фактора в развитии соматических эффектов в лимфоцитах и фибробластах человека и животных в пренатальном и постнатальном онтогенезе.

Связь работы с крупными научными программами. Настоящая работа является частью НИР Института радиобиологии АНБ, проводимых в соответствии с Госпрограммой по преодолению последствий катастрофы на Чернобыльской АЭС "Выяснить влияние радиозкологической обстановки на биохимические, морфологические и физиологические изменения важнейших систем живых организмов. Дать оценку молекулярно-генетических повреждений в условиях хронического действия радиозкологических факторов" (1991 г., раздел 9.1.11).

Цель и задачи исследования. Цель работы - изучить влияние ИИ в малых дозах на характер и направленность процессов пролиферации и дифференцировки, структурных изменений генетического аппарата в некоторых соматических клетках (лимфоциты, фибробласты) человека и животных на разных этапах онтогенеза.

И. И. А. Г. В. Н.

Для достижения поставленной цели предусматривалось решить следующие задачи:

1. Провести анализ аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови взрослого и детского населения проживающего в населенных пунктах Хойникского района Гомельской области.

2. Изучить особенности клонообразования в популяции фибробластов человека и животных в эмбриональном, плодном и раннем постнатальном периодах развития в норме и после острого гамма-облучения *In vitro* (0,5; 1,0 и 2,0 Гр).

3. Изучить особенности реакции фибробластов 20-суточных плодов после однократного внешнего острого (0,5 и 2,0 Гр) и хронического (0,45 Гр) гамма-облучения в эмбриогенезе (стационарное исследование).

4. Оценить влияние радиационного фактора на хромосомный аппарат, пролиферативный потенциал и процессы цитодифференцировки фибробластов 20-суточных плодов и новорожденных крысят, развивающихся внутриутробно в 10-км зоне аварии на ЧАЭС.

Научная новизна полученных результатов. Проведено комплексное исследование действия малых доз ИИ на хромосомный аппарат, процессы пролиферации и дифференцировки некоторых соматических клеток на разных этапах пренатального и постнатального онтогенеза человека и белой крысы.

Автором разработаны и использованы в данной работе:

модель клональной характеристики популяции нормальных фибробластов крысы для оценки пролиферативного потенциала и степени дифференцировки клеток на разных стадиях развития животного (пренатальная и ранняя постнатальная);

- метод культивирования эмбриональных фибробластов крысы для исследования хромосом;

Установлены видовые различия в структуре популяций фибробластов зародышей человека и белой крысы. По мере внутриутробного развития зародышей белой крысы в кожно-мышечной ткани накапливаются клетки с относительно высоким потенциалом деления (FII), а в ранней постнатальной жизни (новорожденные крысята 2-х суточного возраста) увеличивается доля клеток с ограниченным потенциалом пролиферации (FIII)

Показано, что действие ИИ разных типов облучения в малых дозах (в экспериментальных моделях), а также сочетанное действие хронического облучения с факторами окружающей среды нарушают

структуру хромосом, изменяют процессы дифференцировки и пролиферативный потенциал клеток человека и животных в разные периоды онтогенеза. Наблюдаемые эффекты особенно выражены в лимфоцитах детского организма и фибробластах зародышей экспериментальных животных (белая крыса), развивающихся внутриутробно в зоне аварии на ЧАЭС.

Результаты исследований расширяют и углубляют представления о влиянии малых доз ИИ на генетический аппарат, пролиферативный потенциал и процессы дифференцировки соматических клеток на разных стадиях онтогенеза; они могут использоваться для прогнозирования состояния здоровья населения и его потомства.

Практическая значимость полученных результатов. На основании экспериментальных данных разработан "Способ анализа популяции фибробластов человека" Изобретение относится к биологии и может быть использовано для изучения клеточных основ (естественного и индуцированного) старения организма.

Изобретение "Способ анализа популяции фибробластов человека" (Патент № 2017818 от 15.08.1994 г.) внедрено в НИИ наследственных и врожденных заболеваний МЗ Беларуси с целью изучения наследственных аномалий развития органов и тканей у зародышей человека.

Результаты исследований являются предпосылкой для разработки новых методов биодозиметрии при хроническом облучении организма.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У населения, проживающего на территории загрязненной радионуклидами (населенные пункты Хойникского района Гомельской области Беларуси), в течении ряда лет наблюдается увеличение частоты встречаемости aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови. В спектре типов структурных нарушений хромосом отмечаются как возрастные, так и половые особенности.

2. Острое гамма-облучение популяций фибробластов зародышей человека *In vitro* (0,5; 1,0 и 2,0 Гр) и зародышей белой крысы на 9-е и 15-е сутки их развития (0,5 и 2,0 Гр) приводит к нарушению процессов клеточного деления и дифференцировки, что проявляется в нарастании доли клеток с ограниченным потенциалом пролиферации (фиброциты I и фиброциты II у человека; клеток FIII у 20-суточных плодов крысы). Выявлены различия в частоте встречаемости и спектре типов aberrаций хромосом фибробластов 20-суточных плодов в зависимости от периода их внутриутробного развития и вели-

чины дозы. Они наиболее выражены при облучении в дозе 0,5 Гр на 15-е сутки внутриутробного развития, и 2,0 Гр при облучении на 9-е сутки эмбриогенеза. Изменения в структуре хромосом обнаруживаются и у плодов второго поколения.

3. Хроническое действие ИИ в дозе 0,45 Гр в период пренатального развития зародышей белой крысы вызывает структурные изменения хромосом и стимулирует эффективность клонирования кожно-мышечных фибробластов 20-суточных плодов.

4. Радиэкологическая обстановка, сложившаяся в 10-км зоне аварии на ЧАЭС, оказывает существенное влияние на внутриутробное развитие 20-суточных плодов и новорожденных крысят, вызывая регистрируемые изменения процессов пролиферации, дифференцировки и структуры хромосомного аппарата в фибробластах их кожно-мышечной ткани.

Личный вклад. Л. Н. Николаевич лично выполнена экспериментальная часть работы, проанализировано большое количество литературы по данному вопросу, сделаны научно обоснованные выводы, оформлена диссертационная работа. Научный руководитель диссертации д. м. н., профессор А. П. Аивросьев принимал участие в определении основной цели и задач исследования, а также в обсуждении результатов.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены на I Всесоюзном радиобиологическом съезде (Москва, 1989), пленуме "Радиобиологические аспекты генетики" и совещании "Генетические аспекты воздействия радиации на популяции и экосистемы в связи с аварией на ЧАЭС" (Пущино, 1990), Всесоюзной конференции "Актуальные проблемы радиобиологии и радиационной генетики" (Обнинск, 1990), II Всесоюзном съезде медицинских генетиков (Алма-Ата, 1990), Всесоюзной конференции "Радиобиологические последствия аварии на Чернобыльской АЭС" (Минск, 1991), XI съезде анатомов, гистологов и эмбриологов (Смоленск, 1992), II Всероссийской конференции "Влияние антропогенных факторов на структуру преобразования органов, тканей, клеток человека и животных" (Саратов, 1993), международной конференции "Наука и медицина Чернобыль" (Минск, 1993), белорусско-японском симпозиуме "Ближайшие и отдаленные последствия ядерных катастроф: Хиросима Нагасаки и Чернобыль" (Минск, 1994), IV Международной конференции "Чернобыльская катастрофа: прогноз, профилактика, лечение и медикопсихологическая реабилитация пострадавших" (Минск, 1995)

Опубликованность результатов диссертации. По теме диссертации опубликовано 22 работы, из них 7 статей, 14 тезисов и 1 патент на изобретение "Способ анализа популяции фибробластов человека"

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, 7 глав, выводов и списка использованных источников. Работа изложена на 144 страницах машинописного текста, иллюстрирована 39 таблицами и 29 рисунками. Список использованных источников включает 254 названия, из которых 128 на русском, 3 белорусском и 123 английском языках. Общий объём рукописи составляет 183 страницы машинописного текста.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена с использованием комплекса методов: культивирования соматических клеток, клонирования, анализа метафазных хромосом, цитоморфологического анализа клонов, эмбриологического, светооптического, а также методов математической статистики.

Облучение проводили в диапазоне малых доз - 0,05 - 0,5 Гр, а также для сравнения выбрали дозы 1,0 и 2,0 Гр.

Эксперименты выполнены на беспородных крысах стадного разведения. Подопытных самок (четырёхмесячного возраста) в стадии эструса подсаживали к самцам в соотношении 3:1. Первый день беременности определяли по наличию сперматозоидов в вагинальных мазках. Часть этих животных подвергалась однократному внешнему γ -облучению в дозах 0,5 и 2,0 Гр на 9-е и 15-е сутки беременности на установке "ИГУР" (^{137}Cs , мощность дозы 6,2 Р/мин), другая часть - хроническому облучению на установке "Гаммарид" (^{137}Cs , мощность дозы 110 мР/час) в течение 19 суток (общая доза 0,45 Гр). Кроме того, специальная группа беременных самок была размещена в 10-м зоне ЧАЭС и находилась там в течение 18 суток (мощность дозы гамма-излучения - 4,5 мР/час; доза - 0,05 Гр).

Материалом исследования служили кожно-мышечные фибробласты зародышей 9-и, 15-и, 20-и суточного возраста белой крысы и 2-суточных новорожденных крысят (всего 283). Изучалась также культура эмбриональных фибробластов, выделенная из тканей 8-недельных зародышей человека (всего 15 зародышей) и лимфоциты периферической крови людей (54 взрослых и 34 детей).

Эффекты действия ИИ на соматические клетки развивающегося организма животных изучали на стадии завершения внутриутробного развития зародыша (20-суточный плод) и у новорожденных крысят (2-е суток после рождения). Кроме того, мы исследовали зародышей второго поколения, родители которых были облучены однократно в дозе 0,5 Гр на 15-е сутки эмбриогенеза. Контрольные животные находились в условиях вивария. В каждом эксперименте брали 30 животных для контрольной и опытной групп.

С целью разработки способов оценки радиационного старения организма человека использовали культуру эмбриональных фибробластов как экспериментальную модель (Гринберг, 1988). Монослойную культуру в логарифмической фазе роста облучали на установке ЛМБ-гамма-1м (^{137}Cs , мощность дозы 40 Р/мин) в дозах 0,5; 1,0 и 2,0 Гр.

Для изучения процессов пролиферации и дифференцировки фибробластов, мы использовали модель клональной характеристики популяций фибробластов зародышей человека и белой крысы. Анализ клонов эмбриональных фибробластов человека проводили по С.М. Терехову (1984), а фибробластов зародышей и новорожденных крысят по J. Mollenhauer, K. Bayreuther (1986) в нашей модификации. Общее число проанализированных клеток в клонах составило 672108 фибробластов человека и 207092 - у зародышей белой крысы. Проллиферативный потенциал фибробластов оценивали по эффективности клонирования (ЭК), которую выражали в % как отношение числа колоний к числу посеянных клеток. Митотическую активность дочерних клеток в клонах изучали по размеру колоний, который выражали через число генераций одиночных клеток (\log_2 от числа клеток, составляющих колонию).

Препараты метафазных хромосом фибробластов зародышей белой крысы готовили по методу разработанному автором (Николаевич и др., 1994) Методы анализа структурных aberrаций и их классификация соответствовали общепринятым (Дыбан, Баранов, 1978; Захаров и др., 1982). Анализировали 50-100 метафаз от каждого зародыша и новорожденного животного (всего 7745), а также 100-350 лимфоцитов периферической крови человека (без кариотипирования) (общее количество клеток - 20417).

Обследованное население было разделено на группы в зависимости от плотности загрязнения местности проживания радионуклидами цезия-137 и дозовой нагрузки: 1-я группа - 23 чел (5-15

Ки/кв. км; эффективная эквивалентная доза-60,0 мЗв) 2-я группа- 13 чел (15-20 Ки/кв. км; эффективная эквивалентная доза-80,0 мЗв)

В качестве контроля обследовали взрослое (18 чел) и детское (13 чел) население из г. Березино Минской области. Поглощенную дозу рассчитывали по трем цитогенетическим показателям (доле aberrантных клеток, общему числу aberrаций хромосом на 100 клеток, сумме дицентриков и колец) на основе линейно-квадратической модели (Севаньякаев, Насонов, 1979). Статистическую обработку полученных данных проводили на базе программного пакета РС - МАТ-ЛАБ для ЭВМ РС АТ. 386. Достоверность оценивали по критерию Стьюдента на основании метода Монте-Карло (Соболь, 1978).

Структурные аномалии хромосом лимфоцитов периферической крови людей, проживающих на загрязненных радионуклидами территориях Хойникского района Гомельской области

Цитогенетическое обследование взрослого населения показало, что по мере увеличения плотности загрязнения территории цезием-137 в среднем в 1,5 раза возрастает частота встречаемости aberrантных клеток и в 5-6 раз aberrаций хромосомного типа (дицентрические и кольцевые хромосомы) в их периферической крови (рис. 1).

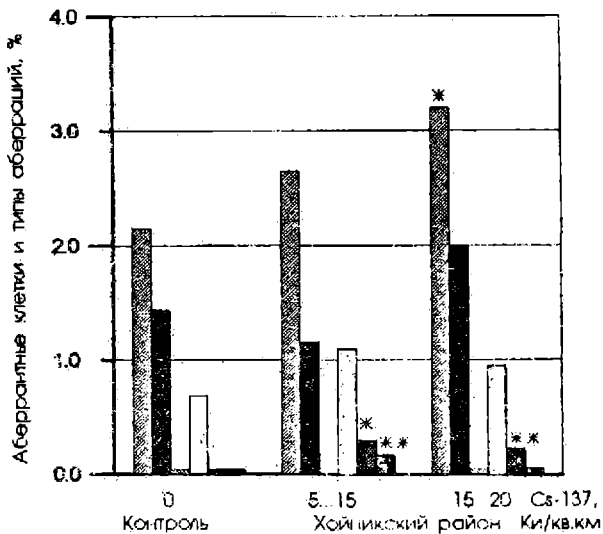


Рис. 1. Аберрации хромосом в лимфоцитах взрослого населения.

Обозначения: aberrантные клетки; - одиночные фрагменты; - обмены хроматидного типа; - парные фрагменты; дицентрические хромосомы; кольцевые хромосомы; * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.01$

Эффект действия ИИ сильнее проявился у лиц, проживающих на территории с плотностью загрязнения радионуклидами цезия-137 от 5 до 15 Ки/кв. км, у которых имеют место различия в характере распределения этого типа аномалий по сравнению с группой лиц, проживающих на территории с плотностью загрязнения изотопами цезия-137 свыше 15 Ки/кв. км.

С увеличением возраста людей отмечается достоверное повышение частоты встречаемости aberrантных клеток и aberrаций хромосомного типа (20-40 лет 2,57% и 0,21%; 40-65 лет 3,15% и 0,61 соответственно)

Наряду с этим мы выявили статистически достоверные различия в спектре типов aberrаций хромосом лимфоцитов периферической крови женщин и мужчин. У женщин в возрасте 40-65 лет повышена частота встречаемости нарушений хромосомного типа (парные фрагменты - 1,22%; дицентрические и кольцевые хромосомы 0,77%), в других возрастных группах (20-40- и 65-80 лет) хроматидного типа (одиночные фрагменты 1,69% и обмены 1,01%) ($P < 0,05$). У мужчин в возрасте от 40 до 65 лет отмечается увеличение в 2 раза уровня структурных нарушений в виде хроматидных фрагментов (1,52%) ($P < 0,05$); дицентрические и кольцевые хромосомы у них составляют 0,43%. У лиц в возрасте 20-40 лет, напротив, наблюдается снижение числа aberrаций хроматидного типа (0,71%), дицентрических и кольцевых хромосом (0,26%, $P < 0,05$) и незначительное увеличение парных фрагментов (1,13%).

Подобные нарушения наиболее выражены у детей (рис. 2)



Рис. 2. Спектр aberrаций хромосом (детское население).

Обозначения: 1 - дицентрики и кольца; 2 - парные фрагменты;

3 - обмены хроматидного типа; 4 - одиночные фрагменты.

Число аберраций на клетку у них в 1,5 раза превышает контрольные показатели. В спектре типов аберраций преобладают парные фрагменты, дицентрические и кольцевые хромосомы, которые в 1,5-3,0 раза превышают контроль. При повторном обследовании этих детей (1991 г.) доля дицентриков и колец значительно возрастает, что свидетельствует о постоянном действии радиационного фактора.

Поглощенная доза, рассчитанная по цитогенетическим показателям, в 2,5 раза превышает дозу полученную методами физической дозиметрии (Barkhudarov et al., 1986; Avetisov et al., 1988). Поскольку условия облучения в результате аварии на ЧАЭС существенно отличаются от тех, при которых были построены калибровочные кривые, использование последних для биологической дозиметрии возможно только с определенными поправками. Вместе с тем нами отмечена прямая зависимость между величиной поглощенной дозы и средней частотой встречаемости аберрантных клеток, в то время как для дицентриков и колец подобной зависимости не выявлено.

С целью более углубленного анализа механизмов радиационного воздействия на клеточные структуры развивающегося организма нами изучены процессы дифференцировки, пролиферативной активности и состояние структуры хромосомного аппарата других соматических клеток, в частности фибробластов кожно-мышечной ткани в норме и в условиях их облучения в сравнительно небольших дозах.

Влияние ионизирующих излучений на структуру и процессы цитодифференцировки эмбриональных фибробластов человека

Популяция фибробластов зародышей человека *in vitro* гетерогенна и в клonalных условиях формирует колонии, состоящие из клеток различающихся морфологической характеристикой, степенью дифференцировки и митотической активностью. Малоклеточные колонии (II тип) состоят из фиброцитов I и фиброцитов II (клеток с ограниченным потенциалом деления), а многоклеточные (I тип колоний) - из фибробластов (клеток с высоким потенциалом пролиферации). Наличие смешанных клонов свидетельствует о дифференцировке фибробластов. Этот процесс следует в одном направлении: веретеновидные клетки (фибробласты) с определенной частотой дифференцируются в парусовидные клетки (фиброциты I), последние, в свою очередь, дают начало отростчатым клеткам (фиброцитам II).

Острое облучение первичной популяции фибробластов зародышей человека *in vitro* в дозах 0,5; 1,0 и 2,0 Гр нарушает процессы

пролиферации и цитодифференцировки клеток. При дозе 0,5 Гр наблюдается незначительное увеличение ЭК и только начиная с дозы 1,0 Гр пролиферативный потенциал фибробластов снижается (58,30% - контроль и 66,0%, 36,50%, 19,40% соответственно) ($P < 0,05$). Этот эффект сохраняется и в поколении дочерних клеток, причем он более заметно проявляется в клетках на 5 сутки после их облучения, что свидетельствует о репродуктивной гибели клеток, составляющих популяцию дочерних фибробластов.

Выявлены изменения в соотношении типов клонов: доля колоний II типа возрастает (25,77% контроль и 35,77%, 55,36%, 62,81% соответственно) ($P < 0,01$), а остальных - снижается ($P < 0,05$). Наблюдаемое изменение в соотношении разных форм клеток в клонах человека, по-видимому обусловлены как повышенной радиочувствительностью веретеновидных клеток, так и ускорением процессов их дифференцировки в фиброциты I и фиброциты II.

Установлено, что облучение в дозе 0,5 Гр по сравнению с дозами 1,0 и 2,0 Гр резко угнетает пролиферацию дочерних фиброцитов I (малоактивных клеток), о чем свидетельствуют такие показатели как снижение количества клеток в клонах II типа и уменьшение числа клеточных генераций по сравнению с контролем.

По мере увеличения дозы (1,0 и 2,0 Гр) в первичной популяции фибробластов человека увеличивается субпопуляция клеток, включающих фиброциты I и фиброциты II, которая особенно возрастает после облучения в дозе 1,0 Гр ($P < 0,05$).

Следовательно, накопление малоактивных клеток (фиброцитов I фиброцитов II) после действия ИИ может быть одним из показателей радиационного старения клеточных популяций организма.

Реакция соматических клеток на облучение в ранние стадии онтогенеза белой крысы

Нами выявлены особенности реакции клеток на действие ИИ в эмбриогенезе экспериментальных животных. Прежде всего это касается процессов клонообразования, пролиферации и цитодифференцировки кожно-мышечных фибробластов зародышей белой крысы.

Установлено, что в норме популяция первичных эмбриональных фибробластов крысы состоит из клеток различающихся между собой по морфологическим характеристикам и пролиферативной активности (клетки FI, FII и FIII). Наибольшим потенциалом деления, обладают парусовидные клетки FII, которые формируют многоклеточные кс

лонии II типа и совершают большее количество генераций по сравнению с веретенновидными и плейоморфными фибробластами (FI и FIII соответственно). Колонии, сформированные из клеток FI (I типа) и FIII (III типа) - малоклеточные и состоят из клеток с ограниченным потенциалом пролиферации. Смешанные колонии включают все типы клеток и их наличие свидетельствует о динамичности процессов дифференцировки, происходящих в клонных популяциях.

Обнаружено, что в норме по мере развития зародыша (на 9-е, 15-е и 20-е сутки) в кожно-мышечной ткани происходит накопление клеток с относительно высоким потенциалом деления (FII). В ранней постнатальной жизни у новорожденных крысят (2-е суток после рождения) - увеличивается доля клеток с ограниченным потенциалом пролиферации (FIII).

Острое внешнее облучение в дозе 0,5 Гр на 9-е и 15-е сутки эмбриогенеза повышает пролиферативную активность (в 2 раза) и ускоряет процессы дифференцировки в популяции фибробластов 20-суточных плодов крысы, что подтверждается увеличением числа колоний смешанного типа. Наблюдаемый эффект особенно выражен у плодов, облученных на 9-е сутки эмбриогенеза.

Выявлены различия в частоте встречаемости и спектре типов aberrаций хромосом фибробластов 20-суточных плодов, облученных в дозе 0,5 Гр на 9-е и 15-е сутки их внутриутробного развития (рис. 3 а, б).

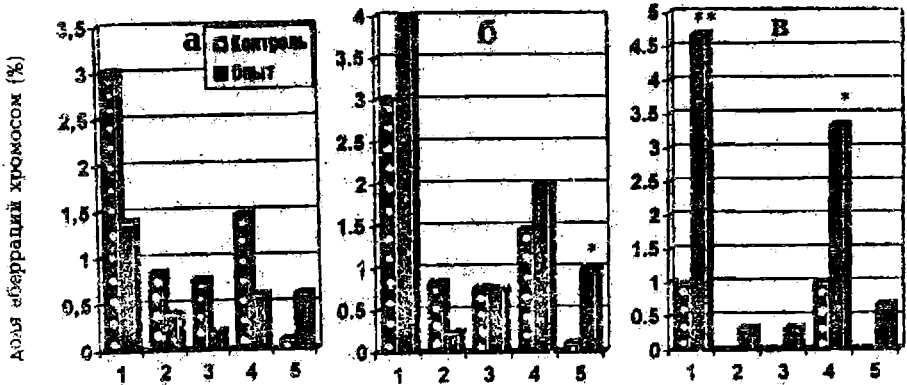


Рис. 3. Анализ aberrаций хромосом в фибробластах плодов белой крысы после острого облучения в дозе 0,5 Гр

Обозначения: а - плоды, облученные на 9-е сутки развития; б - плоды, облученные на 15-е сутки эмбриогенеза; в - плоды второго поколения. 1 - aberrантные клетки; 2 - одиночные фрагменты; 3 - хроматидные обмены; 4 - парные фрагменты; 5 - хромосомные обмены.

* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

Рост aberrаций хромосом отмечается и в клетках плодов второго поколения (4,67% и 1,00% соответственно) (рис. 3 в)

При облучении в дозе 2,0 Гр частота встречаемости aberrантных клеток выше у плодов, облученных на 9-е сутки эмбриогенеза по сравнению с плодами, облученными на 15-е сутки развития (10,31% и 4,81% соответственно). О нарушении процессов клеточного деления в тканях развивающихся зародышей, облученных на 9-е и 15-е сутки эмбриогенеза, свидетельствует увеличение здесь количества гипо- и гипердиплоидных клеток.

Таким образом, наблюдаемые эффекты в реакции фибробластов 20-суточных плодов крысы после острого облучения находятся в зависимости от периода внутриутробного развития зародышей и величины дозы.

Реакция соматических клеток на хроническое облучение в стационарных условиях и при содержании животных в зоне аварии на ЧАЭС

В условиях хронического облучения зародышей крысы в период их внутриутробного развития (доза 0,45 Гр) у 20-суточных плодов в 1,5 раза повышается ЭК фибробластов. В спектре типов колоний в 1,5 раза снижается доля колоний III типа ($P < 0,05$); количество колоний I и II типов не изменяется. Отмечено увеличение количества смешанных колоний, что указывает на ускорение процессов дифференцировки в клоновых популяциях.

Количество клеток в клонах I, II и III типов возрастает, что свидетельствует о повышенной митотической активности дочерних фибробластов, находящихся в разной степени дифференцировки. Клетки FI, FII и FIII облученных зародышей проходят большее число генераций по сравнению с фибробластами зародышей контрольных животных. В кожно-мышечной ткани этих плодов накапливаются клетки с высоким потенциалом деления (FII) и в 2 раза снижается количество малоактивных клеток (FIII). Это очевидно способствует увеличению доли aberrантных клеток (4,5 раза) по сравнению с контрольными значениями (рис. 4 а).

У плодов и новорожденных крысят из зоны (доза 0,05 Гр) в 2-2,5 раза возрастает число aberrантных клеток (см. рис. 4 б, в) Встречаются дицентрические и кольцевые хромосомные структуры, которые отсутствуют у контрольных зародышей и у облученных в условиях стационара.

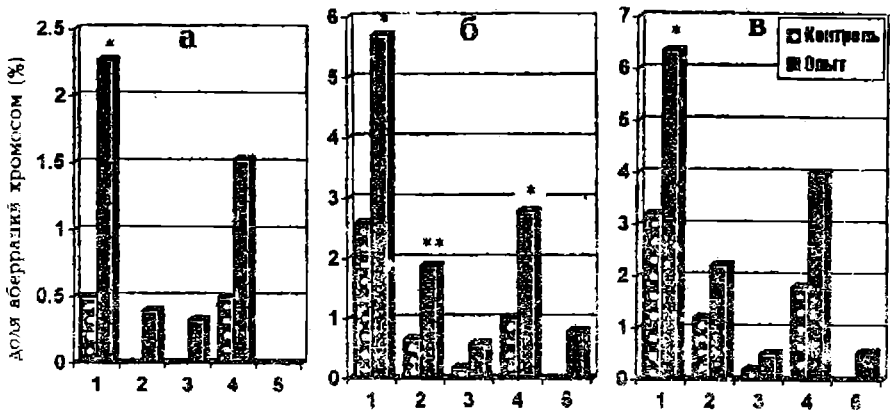


Рис. 4. Аберрации хромосом в фибробластах плодов и новорожденных крысят, развивающихся внутриутробно в условиях хронического облучения и в зоне аварии на ЧАЭС.

Обозначения: плоды (20-е сутки развития) после хронического облучения в дозе 0.45 Гр (а); плоды (5) и новорожденные крысят, развивающиеся пренатально в 10-км зоне аварии на ЧАЭС. 1 - аберрантные клетки; 2 - одиночные фрагменты; 3 - хроматидные обмены; 4 - парные фрагменты; 5 - хромосомные обмены. * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.01$

Отмечается специфическая реакция клеток на условия облучения и в спектре типов колоний. У плодов крысы из зоны наблюдается увеличение доли колоний III типа (28,49% и 15,31% соответственно) и сокращение числа клонов II типа (41,23% и 54,94% соответственно). У новорожденных крысят, напротив, возрастает доля колоний II типа (60,46% и 36,68% соответственно; $P < 0,05$) и достоверно снижается количество колоний III типа (12,01% и 31,01% соответственно). Результаты анализа количества клеток в колониях фибробластов у плодов крысы, экспонированных в зоне аварии на ЧАЭС показали, что дочерние клетки FI и FIII (в противоположность с клетками FII) имеют повышенную пролиферативную активность и проходят большее число генераций по сравнению с клетками контрольных плодов. У новорожденных крысят отсутствует субпопуляция клеток, образующих в клональных условиях колонии I типа. Количество клеток FII в клоне снижается, в то время как доля клеток FIII возрастает по сравнению с контрольными значениями, а также изменяется число генераций дочерних фибробластов и в 1,5 раза снижается ЭК. Изменение кинетики дочерних фибробластов разных морфотипов, способствует увеличению в кожно-мышечной ткани

плодов доли клеток с ограниченным потенциалом пролиферации и накоплению у новорожденных крысят фибробластов с высоким потенциалом деления.

Таким образом, наблюдаемые эффекты свидетельствуют о наличии значительных изменений в геноме различных функциональных групп соматических клеток (лимфоциты крови, фибробласты кожно-мышечной ткани), возникающих после острого и хронического облучения в экспериментальных моделях и под действием факторов среды. Особенно эти эффекты выражены у плодов и новорожденных крысят, находящихся в период внутриутробного развития в зоне ЧАЗС.

ВЫВОДЫ

1. У населения, проживающего на территориях с различной плотностью загрязнения радионуклидами цезия-137 отмечается увеличение частоты встречаемости аберрантных клеток в среднем в 1,5 раза по сравнению с относительно чистыми районами. Установлено достоверное увеличение числа дицентрических и кольцевых хромосом, которое сильнее выражено у людей 40-65-летнего возраста и детей. Данный эффект достоверно возрастает при увеличении плотности загрязнения территории радионуклидами цезия-137 и зависит от возрастных и половых особенностей обследованных контингентов.

2. Острое облучение популяции эмбриональных фибробластов человека (*in vitro*) в дозах 0,5; 1,0 и 2,0 Гр нарушает процессы их пролиферации и дифференцировки, способствует накоплению клеток с ограниченным потенциалом пролиферации (фиброциты I и фиброциты II).

Показано, что фибробласты (веретеновидные клетки с высокой митотической активностью) обладают повышенной радиочувствительностью, которая сохраняется в поколении дочерних клеток. Фиброциты I и фиброциты II менее радиочувствительны к действию ионизирующих излучений.

3. В популяции фибробластов кожно-мышечной ткани зародышей человека и белой крысы в норме отмечаются качественные различия. У крысы наибольшим потенциалом деления обладают клетки FII, формирующие в клональных условиях многоклеточные колонии II типа. Колонии I и III типов - малоклеточные и состоят из клеток с ограниченным потенциалом пролиферации (FI и FIII соответственно).

4. Острое внешнее гамма-облучение в дозе 0,5 Гр на 9-е и 15-е сутки эмбриогенеза вызывает разнонаправленные эффекты в реакции фибробластов 20-суточных плодов крысы.

У плодов, облученных на стадии раннего органогенеза (9-е сутки) повышается митотическая активность фибробластов, увеличивается доля смешанных колоний и снижается количество aberrантных клеток; у плодов, облученных на стадии позднего органогенеза (15-е сутки) также повышается эффективность клонирования фибробластов, но в спектре типов колоний возрастает число клонов, состоящих из малоактивных клеток при этом увеличивается и доля aberrантных клеток. В обоих случаях частота встречаемости клеток с дисцентрическими и кольцевыми хромосомами повышается, изменяется соотношение анеуплоидных клеток. Аналогичные aberrации хромосом выявляются у плодов второго поколения.

5. В условиях хронического действия ионизирующих излучений в период внутриутробного развития зародышей крысы (доза 0,45 Гр) в популяции фибробластов 20-суточных плодов наблюдаются эффекты стимуляции: повышение их способности к клонированию, увеличение доли смешанных колоний, возрастание митотической активности дочерних клеток FI, FII, FIII, накопление фибробластов с высоким потенциалом пролиферации и повышение частоты встречаемости aberrантных клеток.

6. В популяции фибробластов 20-суточных плодов, находившихся в течение периода внутриутробного развития в 10-км зоне аварии на ЧАЭС, эффективность клонирования не изменяется; увеличение доли клонов, состоящих из малоактивных клеток FIII, повышение митотической активности дочерних клеток FI и FIII приводит к накоплению фибробластов с ограниченным потенциалом пролиферации. У новорожденных крысят, напротив, снижается эффективность клонирования клеток, в тканях накапливаются клетки с высоким потенциалом деления. И у плодов, и у новорожденных крысят из зоны возрастает частота встречаемости aberrантных и изменяется соотношение анеуплоидных клеток.

7. Наблюдаемые биологические эффекты свидетельствуют о мутагенности среды обитания. Методы оценки пролиферативного потенциала и степени дифференцировки фибробластов в комплексе с анализом aberrаций хромосом других тканевых систем могут быть использованы при проведении биологической дозиметрии хронических воздействий ИИ для оценки состояния здоровья населения в динамике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Квитко О. В., Жукова Л. Н., Николаевич Л. Н. Сравнительный анализ эпигенетической структуры популяции фибробластов человека и мыши // Доклады АН БССР. 1991. Т. 35, N 11. - С. 1031-1033.
2. Роль эпигенетических процессов в наследственной изменчивости / О. В. Квитко, Л. Н. Николаевич Л. Н. Жукова и др. Проблемы генетики: Сборник научных статей. - Мн. Наука і тэхніка, 1994. - С. 216-233.
3. Николаевич Л. Н., Амвросьев А. П., Рогов П. И. Метод культивирования эмбриональных фибробластов крысы для исследования хромосом // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. 1994. N 2. - С. 53-58.
4. Amvrosiev A. P., Nikolaeovich L. N. Radiobiological Effects of Light Ionizing Radiations in Somatic Cells of Human and Animals in Early Ontogenesis // Proc. of Belarus-Japan Symposium "Acute and Late Consequences of Nuclear Catastrophes: Hiroshima-Nagasaki and Chernobyl". - Minsk/Tokyo, 1994. - P. 484-493.
5. Пат. 2017818 РФ, МКИ 5 С 12 N 6/02, 5/00. Способ анализа популяции фибробластов человека / Квитко О. В. и Николаевич Л. Н. (Республика Беларусь). - N 4904835/13; Заявлено 21.09.90; Опубл. 15.08.94, Бюл. N 15. - 5 с.
6. Амвросьев А. П., Николаевич Л. Н. Цитогенетический мониторинг детского населения из регионов с различной радиэкологической обстановкой // Чернобыльская катастрофа: прогноз, профилактика, лечение и медикопсихологическая реабилитация пострадавших: Сб. матер. 4-ой Международной конфер. - Мн.: Из-во Белорусского комитета "Дзеці Чарнобыля", 1995. - С. 245-247.
7. Амвросьев А. П., Николаевич Л. Н. Влияние мутагенных факторов окружающей среды на наследственность человека // Актуальные вопросы влияния на организм лучевой энергии (ионизирующее и лазерное излучение): Сборник научных трудов. - Смоленск: СМГА, 1985. - С. 17-23.
8. Амвросьев А. П., Николаевич Л. Н. Цитогенетические эффекты радиационного загрязнения в некоторых районах Гомельской области // Международные медицинские обзоры. - 1996. Т. 3, N 1. С. 28-32.

Р Е З Ю М Е

Николаевич Лариса Николаевна

"Влияние ионизирующего излучения в малых дозах на некоторые соматические клетки человека и животных на разных этапах онтогенеза"

Ключевые слова: ионизирующее излучение, лимфоциты, фибробласты хромосомные aberrации, пролиферация, дифференцировка, онтогенез.

Материалом исследования служили кожно-мышечные фибробласты зародышей человека и белой крысы, а также лимфоциты периферической крови человека. В работе использовали методы культуры клеток, клонирования, анализ метафазных хромосом, цитоморфологический анализ клонов, эмбриологический, светооптический и статистический.

Цель работы — изучить влияние ионизирующих излучений (ИИ) в малых дозах на характер и направленность процессов пролиферации и дифференцировки, структурных изменений генетического аппарата в некоторых соматических клетках (лимфоциты, фибробласты) человека и животных на разных этапах онтогенеза.

Установлено, что у взрослого и детского населения, проживающего на территории Хойникского района Гомельской области в среднем в 1,5 раза возрастает частота встречаемости aberrантных лимфоцитов в периферической крови. В спектре типов aberrаций выявлены возрастные и половые особенности.

Показано, что действие разных типов гамма-облучения в малых дозах в экспериментальных моделях, а также хроническое действие радиоэкологических факторов в 10-км зоне аварии на ЧАЭС, вызывают структурные нарушения хромосом, изменяют процессы дифференцировки и пролиферативного потенциала фибробластов человека и белой крысы в периоды пренатального и постнатального онтогенеза.

На основании экспериментальных данных предложены способы оценки пролиферативного потенциала и степени дифференцировки фибробластов человека и животных, которые могут использоваться в комплексе с анализом aberrаций хромосом других тканевых систем при проведении биологической дозиметрии хронических воздействий ИИ на организм для оценки состояния здоровья населения и его потомства.

Область применения результатов — радиобиология, медицина, генетика и цитология.

Нікалаевіч Ларыса Мікалаеўна

"Уплыў іанізуючага выпраменьвання у малых дозах на некаторыя саматычныя клеткі чалавека і жывёл на розных этапах антагенезу"

Ключавыя словы: іанізуючае выпраменьванне, лімфацыты, фібрабласты, храмасомныя аберацыі, праліферацыя, дыферэнцыроўка, антагенез.

Матэрыялам даследавання служылі скурна-мышачныя фібрабласты зародкаў чалавека і белага пацука, а таксама лімфацыты перыферычнай крыві чалавека. У рабоце выкарыстоўваліся метады культуры клетак, кланіравання, аналіз метафазных храмасом, цытамарфалагічны аналіз клонаў, эмбрыялагічны, светааптычны і статыстычны.

Мэта работы - вывучыць уплыў іанізуючых выпраменьванняў у малых дозах на характар і накіраванасць працэсаў праліферацыі дыферэнцыроўкі, змяненняў будовы генетычнага апарату у некаторых саматычных клетках (лімфацыты, фібрабласты) чалавека і жывёл на розных этапах антагенезу.

Устаноўлена, што у дарослага і дзіцячага насельніцтва, якое жыве на тэрыторыі Хойніцкага раёна Гомельскай вобласці у сярэднім у 1,5 разы узрасце частата узнікнення аберантных лімфацытаў у перыферычнай крыві. У спектры тыпаў аберацый выяўлены узроставаы і палавыя асаблівасці.

Паказана, што дзеянне гама-апраменьвання розных тыпаў у эксперыментальных мадэлях, а таксама хронічнае дзеянне радыёэкалагічных фактараў у 10-км зоне аварыі на ЧАЭС, вызываюць структурныя парушэнні храмасом, змяняюць працэсы дыферэнцыроўкі праліферацыйнага патэнцыялу фібрабластаў чалавека і белага пацука у перыяды прэнатальнага і ранняга пастнатальнага антагенезу.

На аснове эксперыментальных даных прапанаваны спосабы ацэнкі праліферацыйнага патэнцыялу і ступені дыферэнцыроўкі фібрабластаў чалавека і жывёл, якія могуць выкарыстоўвацца у комплексе з аналізам аберацый храмасом другіх тканкавых сістэм пры правядзенні біялагічнай дазіметрыі хронічных уздзеянняў іанізуючага выпраменьвання на арганізм для ацэнкі стану здароўя насельніцтва і яго патомства.

Вобласць выкарыстання рэзультатаў радыебіялогія, медыцына, генетыка і цыталогія.

S U M M A R Y

Nikolaevich Larisa Nikolaevna **"Effect of low-dose ionizing radiation on some somatic cells** **of man and animals at different ontogenesis stages"**

Key words: ionizing radiation, lymphocytes, fibroblasts, chromosome aberrations, proliferation, differentiation, ontogenesis.

The musculocutaneous fibroblasts of human- and white rat embryos, as well as human peripheral blood lymphocytes were studied. The following methods were used: cell culturing, cloning, metaphase chromosome analysis, cytomorphological clone analysis, embryological, light-optical and statistical ones.

The goal of the research was to study the influence of low-dose ionizing radiation (IR) on the character and trend of proliferation and differentiation processes, structural changes in genetic apparatus in some somatic cells (lymphocytes, fibroblasts) of man and animals at different ontogenesis stages.

It was revealed that in adults and children from Khoinkl District of Gomel Region the occurrence frequency of aberrant lymphocytes in peripheral blood increased on the average 1,5 times. Age and sex peculiarities were detected in the spectrum of aberration types.

The effect of different types of low-dose gamma-irradiation in experimental models and the chronic effect of radioecological factors in the 10-km accident zone of the Chernobyl NPP were shown to cause structural chromosome damage and to change the processes of differentiation and proliferative potential of human and white rat fibroblasts during prenatal and postnatal ontogenesis.

On the basis of the experimental data were proposed the methods for estimating the proliferative potential and the differentiation rate of human- and animal fibroblasts that can be used in a combination with the chromosome aberration analysis of other tissue systems when conducting biological dosimetry of IR chronic effect on organism and estimating the health state of people and their progeny.

The results can be applied in radiobiology, medicine, genetics and cytology

Подписано к печати 19.07.96. Формат 60x84 1/16. Офсетная печать.
Усл.печ.л. 1,16. Уч.-изд.л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ 0290.

ИПП Минэкономики Республики Беларусь. 220004, Минск, пр.Машерова, 23