

Цитогенетические нарушения в лимфоцитах периферической крови у горнорабочих Мурманской области в возрасте до тридцати лет

Пожарская В. В.¹, Петрашова Д. А.²

¹Пожарская Виктория Викторовна / Pozharskaya Viktoriya Viktorovna - кандидат биологических наук, младший научный сотрудник;

²Петрашова Дина Александровна / Petrashova Dina Alexandrovna – кандидат биологических наук, научный сотрудник,

Кольский научный центр Российской академии наук, г. Апатиты

Аннотация: приведены данные по цитогенетическим нарушениям, выявленным в лимфоцитах периферической крови у молодых горнорабочих в возрасте 20-30 лет, занятых на добыче руды, содержащей редкоземельные элементы, в Мурманской области. Показано воздействие ионизирующей радиации на процесс цитокинеза и скорость пролиферации клеток.

Ключевые слова: микроядра, микроядерный тест, лимфоциты, горнорабочие.

Подземная разработка руды, содержащей природные радионуклиды, представляет определенную опасность для здоровья горных рабочих вследствие смешанного облучения различными видами ионизирующего излучения: вдыхание/глотание пылевых частиц, содержащих радий, вдыхание радона и продуктов его распада, внешнее облучение тела, вдыхание пыли смешанных частиц радиоизотопов.

Для оценки генотоксических эффектов ионизирующих источников излучения наиболее широкое распространение получил микроядерный тест, используемый при культивировании клеток периферической крови в условиях цитокинетического блока [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Помимо этого, микроядерный тест на лимфоцитах крови был предложен в качестве одного из простых и быстрых способов оценки дозы облучения [7, 8]. В ряде исследований показано достоверное отличие уровня микроядер от контрольного, начиная с дозы 0,1 Гр, и неточность микроядерного теста при дозе облучения больше 2 Гр [7, 3, 8]. Рядом авторов установлено, что микроядерный тест может эффективно использоваться для выявления радиочувствительных групп повышенного риска [9, 10, 11, 12].

Целью данного исследования являлась оценка цито- и генотоксических эффектов природных источников ионизирующего излучения с помощью микроядерного теста на лимфоцитах крови горняков, пребывающих под землей в условиях смешанного ионизирующего излучения.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования служили образцы лимфоцитов периферической крови горняков, работающих под землей в условиях повышенной концентрации радона (Мурманская область). Взятие биологического материала проводилось в 2013 году в рамках ежегодного медицинского осмотра работников горнорудного производства. Помимо взятия венозной крови, обследуемые интервьюировались по специально разработанному опроснику на наличие вредных привычек и медикаментозного лечения. Все полученные данные вносились в специально разработанную реляционную многопользовательскую базу данных [13]. Все испытуемые были ознакомлены с целью и условиями исследования и дали на участие свое согласие. Группа добровольцев состояла из 67 мужчин, в возрасте от 21 до 68 лет, стаж работы от 1 года до 50 лет. Число молодых специалистов в возрасте 20-30 лет (стаж 1-7 лет), работающих в шахте (руднике), составляло 13 человек. Группа сравнения (14 человек) была представлена одновозрастной группой жителей города Апатиты, не занятых в горнорудном производстве. Для горнорабочих в возрасте 20-30 лет характерен меньший уровень патологий, накопленных со временем, и более низкая вероятность смены места работы по состоянию здоровья или за счет карьерного роста [14, 15].

Для определения генотоксических эффектов производственной среды в клетках лимфоцитов горнорабочих был использован микроядерный тест с цитокинетическим блоком в присутствии цитохалазина Б [1, 2]. В культуру стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитов венозной крови, через 44 часа от начала культивирования клеток, добавляли цитохалазин Б в концентрации 7 мкг/мл. Полное время инкубации в термостате составляло 72 часа. Содержание двуядерных клеток с микроядрами оценивали на основе анализа не менее 1000 двуядерных клеток, т.е. клеток, проходивших первый митоз между 48 и 72 ч после стимуляции фитогемагглютинином.

На препаратах идентифицировали: одноядерные клетки, все полиядерные клетки без нарушений (2-, 3- и 4-ядерные клетки), все полиядерные клетки с микроядром или несколькими микроядрами, а также ядра с насечкой, вакуолизацию ядра, нарушения типа ядерных почек и протрузий. Микроядра идентифицировали как хроматиновые округлые тела с гладким непрерывным краем, размером не более 1/3 ядра, лежащие отдельно от основного ядра, не преломляющие свет, с интенсивностью окрашивания и рисунком хроматина, как у основного ядра, и находящиеся в одной плоскости с ядром [16].

Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа AXIOSTAR PLUS (Karl Zeiss, Германия)

(об.15 x ок.40, 100), оснащенного камерой CoolSNAPes (Photometrics) с цифровой системой регистрации и обработки изображения на базе ПЗС (Media Cybernetics, Inc.).

Статистическая обработка проводилась с помощью STATISTICA 6.

Статистическая обработка материала проводилась согласно рекомендациям, подготовленным на основе руководящих принципов для проведения исследований с использованием микроядерного теста, разработанным на втором заседании «Международной рабочей группы по оценке генотоксичности» (Вашингтон, США, 25-26.03.1999) [17].

Результаты и обсуждение

Анализ препаратов работников рудника всех возрастов показал, что наибольшее число лимфоцитов с микроядрами в проанализированных препаратах работников рудника отмечалось у мужчин в возрасте 31-40 лет ($17,4 \pm 2,2$). Среднее число лимфоцитов с микроядрами достигало $16,1 \pm 0,9$ клеток, что соответствует значениям для жителей российских городов – от 8,6 до 27,0 [8, 11, 15, 18, 19, 20].

Максимальное значение числа бинуклеарных лимфоцитов с микроядром ($16,9 \pm 2,5$) было характерно для работающих в условиях хронического облучения в течение 21-30 лет, в некоторых случаях до 30 двуядерных клеток с микроядром на 1000 двуядерных клеток.

Анализ препаратов лимфоцитов периферической крови молодых горнорабочих показал, что среднее арифметическое значение двуядерных клеток без идентифицированных нарушений, составляло $956,1 \pm 2,2$ на 1000 двуядерных клеток ($972,3 \pm 3,5$ у контрольной группы).

При сравнении группы обследованных горняков, в возрасте от 20 до 30 лет (стаж 1-7 лет) с одновозрастной группой жителей города Апатиты, не занятых в горнорудном производстве, установлено, что у подверженных хроническому облучению лиц наблюдается большее число клеток с микроядром ($13,4 \pm 2,2$ против $10,7 \pm 0,9$ в контрольной группе).

Такие типы нарушений, как протрузии, ядерные почки и круговые насечки на ядре, встречались в обеих группах. Частота встречаемости их не превышала 0,17%. В контрольной группе регистрировалось меньшее число полиядерных клеток на 1000 клеток (2-яд.кл. $416,9 \pm 65,0$; 3-яд.кл. $3,4 \pm 0,7$; 4-яд.кл. $0,1 \pm 0,1$ против $620,6 \pm 38,2$; $9,8 \pm 2,0$; $1,8 \pm 0,6$ соответственно в группе молодых работников рудника), что свидетельствует о большей продолжительности клеточного цикла относительно группы добровольцев, подверженных хроническому облучению, и подтверждается индексом пролиферации.

Заключение

В ходе обследования людей, чья производственная деятельность связана с хроническим воздействием ионизирующего излучения, установлено, что на количество цитогенетических нарушений основное влияние оказывают производственный стаж и возраст работающих в данных условиях.

Проведенные исследования показали, что цитогенетические особенности в лимфоцитах периферической крови, вызванные облучением смешанными источниками ионизирующего излучения природного происхождения, у лиц, подверженных данному воздействию в период работы, проявляются в более высоком числе двуядерных лимфоцитов с микроядрами относительно одновозрастной группы лиц, не имевших в анамнезе факторов радиационных воздействий. Учет всех типов лимфоцитов в культурах цельной крови показал, что в крови контрольной группы число полиядерных клеток меньше, чем у группы добровольцев, подверженных хроническому облучению, что свидетельствует об уменьшении продолжительности клеточного цикла у группы горняков. Возрастание числа многоядерных клеток в группе горняков, по сравнению с контрольной группой, также может свидетельствовать о воздействии ионизирующей радиации на процесс цитокинеза, нарушение которого может приводить к появлению многоядерных клеток.

Литература

1. Fenech M., Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay // Cytobios, 1985. Vol. 43. № 172–173. P. 233–246.
2. Yager J. W., Sorsa M., Selvin S. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs // IARC Sci Publ., 1988. Vol. 89. P. 213–216.
3. Колюбаева С. Н., Ракецкая В. Б., Борисова Е. А., Комар В. Е. Исследование радиационных повреждений в лимфоцитах человека методом микроядерного и хромосомного анализа // Радиационная биология. Радиоэкология, 1995. Т. 35. Вып. 2. С. 150-156.
4. Mateica R., Lombaert N., Aka P. V., Decordier I., Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring// Biochimie 88, 2006. P. 1515–1531.
5. Колюбаева С. Н. Использование цитогенетических методов в радиационной медицине // Вестник Рос. Воен.-мед. акад., 2008. Т. 23. № 3. С. 179-180.
6. Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Алещенко А. В., Антошина М. М., Готлиб В. Я., Конрадов А. А., Кудряшова О. В., Лизунова Е. Ю., Осипов А. Н., Рябченко Н. И., Серебряный А. М. Молекулярно-клеточные последствия аварии на ЧАЭС // Радиц. биология. Радиоэкология, 2011. Т. 51, № 1. С. 154-

7. *Thierens H.* Biological dosimetry using micronucleus assay for lymphocytes: interindividual differences in dose response // *Health Phys.*, 1991. Vol. 61, № 5. P. 623 – 630.
8. *Колюбаева С. Н.* Хромосомные aberrации, микроядра и апоптоз в лимфоцитах при радиационных воздействиях и других патологических состояниях: автореф. дис. доктора биол. наук. Обнинск, 2010. 34 с.
9. *Севанкаев А. В., Моисеенко В. В., Цыб А. Ф.* Возможности применения методов биологической дозиметрии для ретроспективной оценки доз в связи с последствиями аварии на Чернобыльской АЭС. Оценка доз на основе анализа нестабильных хромосомных aberrаций // Радиационная биология. Радиоэкология, 1994. Т. 34. Вып. 6. С. 782-792.
10. *Петрашова Д. А., Пожарская В. В., Муравьев С. В.* Цитогенетические нарушения в букальном эпителии у горнорабочих Мурманской области в возрасте до тридцати лет // Проблемы современной науки и образования. № 26 (68), 2016. С. 26-32.
11. *Пожарская В. В., Петрашова Д. А.* Роль особенностей учета цитогенетических аномалий при оценке воздействия генотоксических факторов окружающей среды на примере лимфоцитов крови человека // Математические исследования в естественных науках. Труды X Всероссийской научной школы. Апатиты, Геологический институт Кольского НЦ РАН, Кольское отделение РМО. Апатиты: Изд-во К & М, 2015. С. 198-205.
12. *Петрашова Д. А., Пожарская В. В., Завадская Т. С., Белишева Н. К.* Цитогенетические эффекты воздействия природных источников ионизирующего излучения на работников горно-рудного производства Мурманской области // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2014. Т. № 1. С. 40-42.
13. *Петрашова Д. А., Бурцев А. В.* Разработка базы данных по цитогенетическим показателям на примере исследований, проводимых в Мурманской области // Вестник Кольского научного центра РАН, 2016. № 2. С. 124-136.
14. *Петрашова Д. А., Пожарская В. В.* О проблеме анализа многофакторного воздействия в цитогенетических исследованиях на примере микроядерного теста в клетках букального эпителия человека // Математические исследования в естественных науках. Труды IX Всероссийской научной школы. Апатиты. Геологический институт Кольского НЦ РАН. Кольское отделение РМО. Апатиты: Изд-во К & М, 2015. С. 189-197.
15. *Пожарская В. В.* Микроядра в лимфоцитах периферической крови у жителей высоких широт // Physics of auroral phenomena. 39 Annual seminar. 29 February - 4 March 2016. Apatity, 2016. P. 56.
16. *Tolbert P. E., Shy C. M., Allen J. W.* Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development // *Mut. Res.*, 1992. 271. P. 69-77.
17. *Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M. et al.* Report from the in vitro Micronucleus assay working group // Environmental and molecular mutagenesis, 2000. 35 pp. 167-172.
18. *Ингель Ф. И.* Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток / Экологическая генетика, 2006. Том 4. № 3. С. 38-54.
19. *Серебряный А. М., Аклеев А. В., Алеценко А. В., Антощина М. М., Кудряшова О. В., Рябченко Н. И., Семенова Л. П., Пелевина И. И.* Распределение индивидуумов по спонтанной частоте лимфоцитов с микроядрами. Особенности и следствия // Цитология, 2011. Т. 53, №1. С. 5-9.
20. *Ахмадуллина Ю. Р., Аклеев А. В.* Оценка уровня лимфоцитов периферической крови с микроядрами у потомков первого поколения хронически облученных отцов // Вестник Челябинского государственного университета, 2013. Вып. 2. С. 97-98.