

НЕУМЕРЖИЦЬКА Л.В. ✉, **ТАЛЬКО В.В.**, **ПРОХОРОВА Е.М.**, **АТАМАНЮК Н.П.** ©
 Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»,
 Україна, 04050, м. Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: nncrm_doc@i.ua
 ✉ lneum@bigmir.net, (095) 310-39-04

ЦИТОГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ В КЛІТИНАХ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ – НАЩАДКІВ ПЕРШОГО ПОКОЛІННЯ БАТЬКІВ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ ІНКОРПОРОВАНОГО ¹³¹I

Незважаючи на численні епідеміологічні дослідження, що стосуються віддалених наслідків Чорнобильської катастрофи, ця проблема на жаль недостатньо вивчена. Суттєвий внесок у формування порушень у стані здоров'я поколінь нащадків відіграє внутрішнє опромінення батьків внаслідок інкорпорації радіонуклідів чорнобильського викиду, насамперед ¹³¹I. За результатами цитогенетичних досліджень ймовірним шляхом реалізації таких порушень вважається передача нестабільності геному через опромінені гамети батьків першому поколінню їх нащадків. Водночас, на прояв геномної нестабільності у нащадків опромінених батьків може впливати комплекс негативних чинників нерадіаційного походження. Можливість трансгенераційного впливу ефектів інкорпорованого ¹³¹I можна дослідити в експерименті, в якому виключений вплив нерадіаційних чинників.

Пострадіаційні біологічні ефекти ¹³¹I та його дозоутворення у щитоподібній залозі людини та ссавців вивчалися впродовж багатьох років. Проведено експериментальні дослідження впливу ¹³¹I на функціонування інших систем організму за різних доз та режимів надходження; оцінено цитотоксичність і мутагенність ¹³¹I [1–3].

Серед численних проблем, що виявилися після аварії на ЧАЕС, до найважливіших можна віднести проблему передачі ефекту нестабільності геному через опромінені гамети батьків першому поколінню їх нащадків, що підтверджено як у клінічних, так і в експериментальних дослідженнях [4–5].

Водночас, крім радіаційного впливу (у більшості з невизначеним радіаційним анамнезом, особливо у випадку впливу чорнобильського аварійного викиду), на прояви геномної нестабільності у нащадків опромінених батьків слід враховувати роль складного комплексу несприятливих чинників, провідними з яких є обтяжена спадковість, несприятливе мікросоціальне

середовище, численні медико-біологічні чинники ризику в матері та батька, деякі патологічні стани дитини у віці немовляти, певні особливості раннього дитячого віку [4–7].

Таким чином, у роботах, які стосуються трансгенераційного впливу радіації на стан здоров'я нащадків опромінених батьків, існує певна розбіжність у визначенні чинників, які зумовлюють цей вплив. Незважаючи на зафіксоване погіршення стану здоров'я нащадків, більшість дослідників по-різному інтерпретують можливість радіаційного чинника. Відповідь на можливість трансгенераційного впливу радіації можуть дати експериментальні дослідження, в яких виключений вплив нерадіаційних чинників.

Мету дослідження склало визначення частоти і спектра хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку нащадків щурів, які зазнали впливу інкорпорованого ¹³¹I.

Матеріали і методи

Цитогенетичні дослідження проведені на білих лінійних щурах Вістар обох статей віком 4 міс. Тварин утримували у віварії Інституту ядерних досліджень НАН України на стандартному раціоні і доступі до води. Дослідження виконано у відповідності до Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Закону України № 3447 ІV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2014).

Щурам (самцям та самкам) вводили перорально через зонд розчин Na¹³¹I на дистильованій воді з активністю 27,35 кБк, що формувало дозу опромінення щитоподібної залози у самок 5,8 Гр, у самців 3,75 Гр. Тваринам контрольної групи вводили дистильовану воду. Через добу тварин відсаджували для спаровування. Нащадки першого покоління (F₁) в цьому експерименті були розподілені на групи: контроль – тварини,

народжені від інтактних щурів; тварини, що народжені від обох опромінених батьків $-F_1(\text{♀})(\text{♂})$; від опромінених самок та інтактних самців $-F_1(\text{♀})$; від опромінених самців та інтактних самок $-F_1(\text{♂})$. Доза на щитоподібну залозу плоду в разі опромінення самок складала $0,26 \pm 0,05$ Гр.

Об'єктом цитогенетичного дослідження були клітини кісткового мозку, що мають стабільну мітотичну активність протягом усієї доби. Методика приготування препаратів метафазних пластин клітин кісткового мозку передбачала виконання наступних етапів: за 2 години до забору кісткового мозку тваринам вводили внутрішньочеревинно розчин колхіцину в об'ємі 0,1 % від ваги тіла в дозі 2,5 мг/кг. Після закінчення цього часу тварин виводили з експерименту методом декапітації, виділяли стегнові кістки, зрізали епіфізи, вимивали із кістки кістковий мозок підігрітим до 37°C розчином Хенкса в центрифужну пробірку з тим же розчином, ресуспендували на вортексі або піпетуванням; центрифугували при 1000 об./хв 5 хвилин. Надосадкову рідину відсмоктували, до осаду додавали 8мл підігрітого до 37°C гіпотонічного розчину (0,55 % розчин KCL), ресуспендували і залишали в термостаті при 37°C на 10–15 хвилин. Далі центрифугували, відсмоктували надосадкову рідину, залишаючи осад 0,3 мл, ресуспендували, додавали охолоджений фіксатор (суміш Карнуа, приготовленого *ex tempore*) і залишали у холодильнику при 4°C на 10–15 хв. Після цього суспензію знов центрифугували і тричі промивали фіксатором; осад бажаної щільності краплями наносили на чисте охоложене і вологе предметне скло. Препарат висушували на термостоліку при 60°C , фарбували барвником Гімза.

Цитогенетичний аналіз проводився шляхом візуального перегляду метафазних пластинок за допомогою дослідницького бінокулярного світлового мікроскопа AxioLab фірми Karl-Zeiss з використанням масляної імерсії. Враховували усі структурні та числові аберації хромосомного (парні фрагменти, ацентричні та центричні кільця, дицентрики) і хроматидного (вільні одиночні фрагменти) типів, число хромосом – від 40 до 43 (з урахуванням гіпо- і гіперплоїдності). Відбір метафазних пластинок здійснювали згідно з рекомендаціям з урахуванням таких вимог: цілісність метафазних пластинок, чіткість забарвлення, відсутність або невелике число поперечних накладень хромо-

сом, середня ступінь їх конденсації, відстань метафазних пластинок одна від одної. Від кожної особини, залежно від наявності або відсутності аберацій, досліджувалося по 100–200 метафазних пластинок [8].

Цитогенетичні ефекти оцінювались за частотою аберантних метафаз і числом структурних аберацій хромосом на 100 клітин. Усього проаналізовано 4200 метафазних пластинок: у інтактних тварин (контрольна група) – 600, у трьох піддослідних групах – по 1200 метафаз.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням пакета програм StatisticaBase “BasicStatistical AnalysisMethods”. Вірогідність відмінностей оцінювали за критерієм Стьюдента при рівні $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Результати аналізу цитогенетичних ефектів у клітинах кісткового мозку щурів – нащадків першого покоління батьків, які зазнали дії інкорпорованого ^{131}I та інтактних тварин представлені в таблиці. Як видно з даних, наведених у таблиці, хромосомні аберації в клітинах кісткового мозку спостерігаються в усіх досліджуваних групах. Зареєстровані майже усі типи хромосомних пошкоджень, при цьому домінували аберації хромосомного і хроматидного типу (одиночні та парні ацентричні фрагменти). У клітинах кісткового мозку тварин контрольної групи аберантні клітини представлені незначною кількістю хромосомних і геномних порушень, що відповідає спонтанному рівню. Переважали аберації хроматидного типу, представлені одиночними фрагментами, геномні порушення – анеуплоїдією. Одна клітина в контролі містила анеуплоїд і одиночний фрагмент, що не вплинуло на сумарний рівень пошкоджених метафаз Співвідношення частки хромосомних порушень надгеномними дорівнювало 2,5 до 1. Аберацій хромосомного типу і поліплоїдних клітин у контрольній групі не виявлено.

Цитогенетичний аналіз у нащадків обох опромінених батьків визначив генетичні порушення в клітинах кісткового мозку. Частота аберантних метафаз достовірно перевищувала контрольний рівень ($4,16 \pm 0,54$ на 100 клітин і $0,83 \pm 0,36$ на 100 клітин відповідно). Спектр хромосомних аберацій включав майже всі види хромосомних ушкоджень і суттєво відрізнявся від контрольної групи. Частота структурних пошкоджень хромосом достовірно вища, ніж у контролі, і дорівнювала $4,08 \pm 0,54$ на 100 клітин.

Таблиця. Частота хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку нащадків першого покоління щурів (F₁), які зазнали впливу інкорпорованого ¹³¹I

| Типи | Нащадки обох опромінених батьків F ₁ (♀)(♂) | | | Нащадки опромінених самок F ₁ (♀) | | | Нащадки опромінених самців F ₁ (♂) | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------|-----------|--------|----------------------------------------------|-----------|--------|-----------------------------------------------|------------|-------|
| | n | M±m% | t | n | M±m% | t | n | M±m% | t |
| Фаза | 1200 | | | 1200 | | | 1200 | | |
| клетин | 50 | 4,16±0,54 | 5,13** | 58 | 4,83±0,59 | 5,65** | 16 | 2,25±0,42 | 2,57* |
| х аберацій | 49 | 4,08±0,54 | 4,09** | 49 | 4,08±0,53 | 4,01** | 11 | 0,91±0,26 | 0 |
| | 20 | 1,66±0,36 | 4,61** | 19 | 1,58±0,34 | 4,65** | 3 | 0,25±0,14 | 1,79 |
| | 8 | 0,66±0,22 | 3,00** | 5 | 0,41±0,17 | 2,41* | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 0,42±0,17 | 2,41* | 2 | 0,16±0,10 | 1,6 | 0 | 0 | 0 |
| омосомного типу | 33 | 2,75±0,52 | 5,29** | 26 | 2,16±0,40 | 5,4** | 3 | 0,25± 0,14 | 1,79 |
| и | 16 | 1,35±0,42 | 2,57 | 23 | 1,91±0,38 | 2,06* | 7 | 0,58±0,20 | 0,61 |
| оматидного типу | 16 | 1,35±0,42 | 2,57* | 23 | 1,91±0,34 | 2,06* | 7 | 0,58±0,20 | 0,61 |
| и | 6 | 0,50±0,31 | 0,45 | 11 | 0,92±0,26 | 1,73 | 5 | 0,41±0,17 | 0 |
| и | 3 | 0,25±0,14 | 1,79 | 3 | 0,25±0,14 | 1,79 | 0 | 0 | 0 |
| и | 9 | 0,75±0,24 | 1,29 | 10 | 0,83±0,24 | 1,54 | 5 | 0,41±0,17 | 0 |
| и | 7 | 0,58±0,20 | 1,72 | 5 | 0,41±0,17 | 1,14 | 4 | 0,33±0,14 | 0 |

Примітки: * – достовірність стосовно до контрольної групи, p<0,05; ** – достовірність по стосовно до контрольної групи, p<0,01.

Хроматидні аберації хромосом були представлені одиночними фрагментами і склали 42 % від загального числа аберацій, хоча не набували статистичної значущості. Частота хромосомного типу, вірогідно, збільшена за рахунок парних фрагментів, невеликої частки дицентриків і ацентричних кілець і складала 44 % від загального числа аберацій.

У нащадків опромінених самок та інтактних самців частота хромосомних порушень у клітинах кісткового мозку виявилася достатньо високою за наявності стабільних і нестабільних аберацій. Так, частота аберацій метафаз, що включає структурні і числові аберації хромосом, вища за спонтанний рівень (від 0 до 1,0 %) і, вірогідно, відрізняється від контролю ($4,83 \pm 0,59$ % проти $0,83 \pm 0,36$ % відповідно).

Структурні аберації хромосом у загальній чисельності порушень склали $4,08 \pm 0,53$ на 100 клітин, що значно перевищувало контрольний рівень.

Частота аберацій хромосом нестабільного типу – дицентриків, наявність яких вказує на радіогенний характер хромосомних порушень, достовірно відрізнялася від контролю і дорівнювала $0,41 \pm 0,17$ на 100 клітин. Частота ацентричних кільцевих хромосом не набувала статистичної значущості, хоча за абсолютними цифрами вона була вища, ніж у контролі. Парні і одиночні фрагменти, що являють структурні пошкодження хромосом, були представлені з однаковою частотою і дорівнювали $1,58 \pm 0,34$ і $1,91 \pm 0,34$ на 100 клітин проти 0 і $0,83 \pm 0,36$ в контролі. Зарєстровані також геномні порушення, що склалися з анеуплоїдних і поліплоїдних клітин, проте статистично не достовірні відносно контролю.

Таким чином, підвищений рівень цитогенетичних змін у клітинах кісткового мозку нащадків самок, яким було одноразово введено ^{131}I вказує на негативний вплив тиреоїдної патології, порушень гіпоталамо-гіпофізарної системи та інших факторів ендогенної природи на стабільність геному. Слід зазначити, що самка була опромінена радіоїодом до спарювання з інтактним самцем і до зачаття, коли доза вже накопичувалася в щитоподібній залозі. Крім того, вплив інкорпорованого йоду відбувався як на самку впродовж вагітності, так і на її плід впродовж усього гестаційного періоду. При

вигодовуванні щурят самою відбувалось додаткове внутрішнє опромінення, спричинивши формування перебудов хромосом в соматичних клітинах нащадків як в ембріональному, так і в постнатальному періоді.

Цитогенетичний аналіз клітин кісткового мозку нащадків щурів від опромінених ^{131}I самців та інтактних самок показав, що середньо-групова частота аберацій метафаз перевищує значення цього показника відносно контролю і складає $2,25 \pm 0,42$ на кожні 100 проаналізованих клітин. Хромосомні аберації хоча і були виявлені, але статистично не відрізнялися від контролю.

Порівнюючи частоту хромосомних аберацій у нащадків цієї групи з контролем, можна дійти висновку щодо відсутності ефектів у їх хромосомному апараті. Ймовірно, введення радіоіотопу ^{131}I самцям безпосередньо перед спарюванням з інтактною самою, що відбулося в межах 3-х діб, вплинуло певним чином на механізм біохімічних перетворень процесу сперматогенезу, але не призвело до суттєвих змін у неушкоджених на момент спарювання зрілих сперматозоїдах. За умов цього експерименту максимальне накопичення ^{131}I в щитоподібній залозі самців відбувається на 30 добу і зберігається на цьому рівні упродовж тривалого часу, що можна порівняти з терміном сперматогенезу (50 діб). Можна припустити ймовірність суттєвих змін у хромосомному апараті нащадків за умов спарювання у більш пізні терміни, коли реалізуються радіоіндуковані зміни в сперматозоїдах, зумовлені одноразовим введенням самцям ^{131}I .

Результати проведених досліджень підтвердили дані інших авторів про високу чутливість організму в пренатальному періоді до мутагенної дії радіації щодо індукції не тільки первинної, але й міжпоколінної (трансгенераційної) хромосомної нестабільності.

Висновки

Одноразове введення шурам-батькам радіоіотопу ^{131}I з активністю 27,35 кБк, що формувало дозу опромінення щитоподібної залози у самок 5,8 Гр, у самців 3,75 Гр, індукує в клітинах кісткового мозку утворення хромосомних та геномних порушень, які проявляються у віддалені терміни у їх нащадків першого покоління.

Література

1. Воробцова И.Е. Хромосомная нестабильность у детей облученных родителей // Здоровье детей и радиация: актуальные проблемы и решения. – М., 2006. – Вып. 2. – С. 119–123.
2. Dusman E., Berti A.P., Mariucci R.G., Lopes N.B. Mutagenicity of diagnostic and therapeutical doses of radiopharmaceutical iodine-131 in Wistar rats // Radiat. Environ. Biophys. – 2011. - V. 50 (4). – P. 579–584. doi: 10.1007/s00411-011-0380-y.
3. Воробцова И.Е. Трансгенерационная передача радиационно-индуцированной нестабильности генома // Радиационная биология. – 2006. – Т. 46, № 4. – С. 441–446.
4. Пілінська М.А., Дибський С.С., Дибська О.Б., Педан Л.Р. Виявлення хромосомної нестабільності у нащадків батьків, опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи. – 2005. – № 4. – С. 32–40. ISSN 0564-3783.
5. Степанова С.І., Вдовенко В.Ю., Мішаріна Ж.А. Постнатальні ефекти опромінення плода // Тез. наук.-практ. конф. – К., 2001. – С. 113–114.
6. Агаджанян А.В. Изучение трансгенерационного феномена геномной нестабильности у детей-потомков облученных родителей в результате аварии на ЧАЭС: автореф. дис. на соискан. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». – М., 2008. – 39 с.
7. Сова О.А. Цитогенетичні ефекти в кістковому мозку щурів при тривалому надходженні ¹³¹I // Радиобіологія та радіоекологія. – 2015. – Т. 16, № 3. – С. 277–280.
8. Баріляк І.Р., Дуган О.М., Неумержицька Л.В., Кривошеїн Ю.Г. Методичні рекомендації з оцінки мутагенних властивостей нових лікарських засобів. – К.: Фармакологічний комітет МОЗ України, 1996. – 32 с.

NEUMERZHYTSKA L.V., TAL'KO V.V., PROKHOROVA E.M., ATAMANYUK N.P.

State Institute "National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine",

Ukraine, 04050, Kyiv, Melnikov str., 53, e-mail: nncrm_doc@i.ua

CYTOGENETIC ANALYSIS OF BONE MARROW CELLS IN RATS – DESCENDANTS OF THE FIRST GENERATION OF PARENTS EXPOSED INKORPORATED ¹³¹I

Aim. Among the problems that arose after the accident at the Chernobyl nuclear power plant belongs to the most important problem of the transmission effect of genomic instability through irradiated gametes parents first generation of their descendants. Determine the frequency of chromosomal aberrations in bone marrow cells of the offspring of rats that were exposed to the radioisotope ¹³¹I. **Methods.** Cytogenetic analysis of bone marrow cells in the offspring of the first generation of irradiated both parents exposed the females and intact males and irradiated males and intact females. **Results.** The results of experimental studies have shown that in the descendants of irradiated ¹³¹I females, the frequency of chromosome aberrations in bone marrow cells exceeds the control level (4.83 ± 0.59 % experience, 0.83 ± 0.36 % control). In offspring of exposed parents detected chromosomal abnormalities in bone marrow cells. The frequency of aberrant metaphases was significantly higher than the control level (4.16 ± 0.54 % and 0.83 ± 0.36). Cytogenetic analysis of bone marrow cells descendants of rats exposed to ¹³¹I males showed that chromosomal damage detected not statistically different from controls. **Conclusions.** Cytogenetic analysis showed the presence of chromosomal aberrations in the bone marrow cells of the first generation progeny. The frequency of chromosome aberrations was significantly higher due to specific markers of radiation exposure: paired fragments, dicentric and acentric rings. Results of the study confirmed the findings of other authors on the high sensitivity of the organism in the prenatal period to the mutagenic effects of radiation on the induction of chromosomal instability transgenerational.

Keywords: rats, iodine-¹³¹I, offsprings, the first generation, cytogenetic effects, bone marrow cells.